

DIE BRAUCHBARKEIT VON BETA-PROPIOLAKTON
ZUR WÄSCHE- UND FLÄCHENDESINFEKTION

von

GERHARD CRASS

Mainz 1964

DIE BRAUCHBARKEIT VON BETA-PROPIOLAKTON
ZUR WÄSCHE- UND FLÄCHENDESINFEKTION

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät

der Johannes Gutenberg-Universität zu Mainz

vorgelegt von

GERHARD CRASS

aus Ohl/Bez. Köln

MAINZ 1964

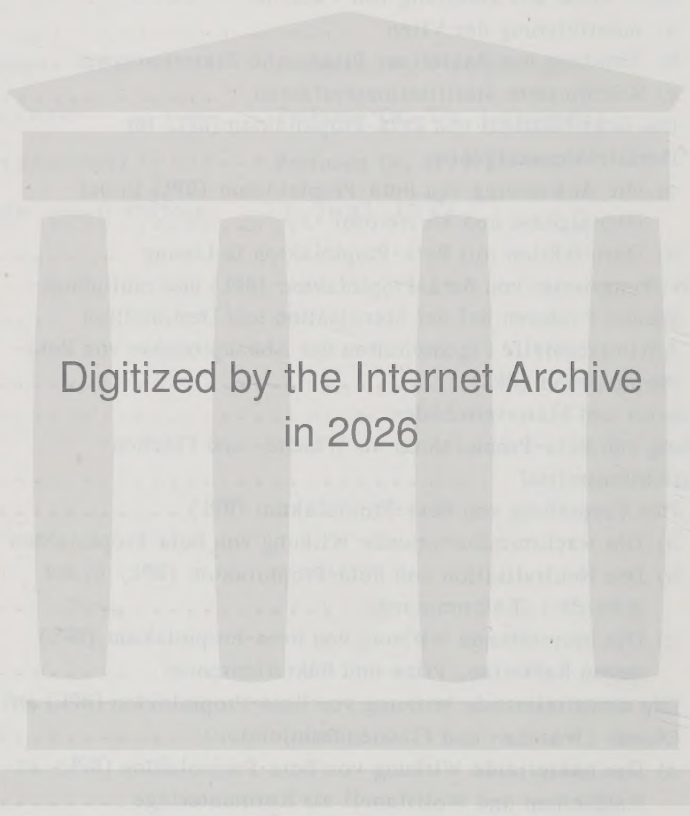


Dekan: Professor Dr. Thomsen
Referent: Professor Dr. Th. Lammers
Korreferent: Professor Dr. H. Kliewe
Tag der mündl. Prüfung: 11. Juni 1964

Gesamtherstellung: DITTERS BÜRODIENST MAINZ
Augustinerstraße 64-66
Telefon 24293



I. Die Bedeutung der chemischen Flächen- und Wäschedesinfektion für Klinik und Praxis	1
II. Physikalische und chemische Eigenschaften von Beta-Propiolakton (BPL)	2
III. Die antimikrobiellen Eigenschaften von Beta-Propiolakton (BPL)	8
1. Bei der Sterilisation von Blut, Plasma, Serum und Transplantaten sowie zur Bereitung von Vaccinen	8
a) Inaktivierung der Viren	9
b) Abtötung von Bakterien, Pilzen und Bakteriensporen	11
c) Kombinierte Sterilisationsverfahren	12
2. Die Brauchbarkeit von Beta-Propiolakton (BPL) für Desinfektionsaufgaben	13
a) Die Anwendung von Beta-Propiolakton (BPL) in der Dampfphase und als Aerosol	13
b) Desinfektion mit Beta-Propiolakton in Lösung	15
3. Wirkungsweise von Beta-Propiolakton (BPL) und einflußnehmende Faktoren bei der Sterilisation und Desinfektion	16
4. Antimikrobielle Eigenschaften der Abbauprodukte von Beta-Propiolakton (BPL)	19
IV. Toxizität und Materialschäden	19
V. Prüfung von Beta-Propiolakton als Wäsche- und Flächen-desinfektionsmittel	24
1. Die Vorprüfung von Beta-Propiolakton (BPL)	24
a) Die wachstumshemmende Wirkung von Beta-Propiolakton	25
b) Die Neutralisation von Beta-Propiolakton (BPL) in der Subkultur (Enthemmung)	26
c) Die keimtötende Wirkung von Beta-Propiolakton (BPL) gegen Bakterien, Pilze und Bakteriensporen	29
2. Die desinfizierende Wirkung von Beta-Propiolakton (BPL) am Objekt (Wäsche- und Flächendesinfektion)	33
a) Die bakterizide Wirkung von Beta-Propiolakton (BPL) an Halbleinen und Wollflanell als Keimunterlage	33
b) Die Desinfektion von Linoleumflächen	36
c) Die fungizide Wirkung von Beta-Propiolakton (BPL) an Holzstäbchen	39
d) Die Abtötung von Sporen an rauen Glasperlen durch Beta-Propiolakton (BPL)	40
VI. Diskussion der gewonnenen Ergebnisse	41
VII. Zusammenfassung	46
Literatur	47



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554404_0009

II. DIE BEDEUTUNG DER CHEMISCHEN WÄSCHE- UND FLÄCHENDESINFEKTION FÜR KLINIK UND PRAXIS

In den letzten Jahren hat sich besonders durch die ausgedehnte Anwendung antibiotischer Mittel gezeigt, daß sich vor allem in Kliniken Bakterien anreichern und zu Kreuzinfektionen führen können, bei denen besonders resistente Staphylokokken, Pseudomonas- und Proteusbakterien sowie pathogene Coli-Typen eine Rolle spielen; ein Zustand, der oft mit dem Schlagwort Hospitalismus gekennzeichnet wird (51). Jedoch auch im außerklinischen Bereich ist immer wieder die Möglichkeit des Auftretens und einer gefährlichen Ausbreitung von Infektionskrankheiten gegeben, begünstigt durch die Zusammenballung von Menschen in den Städten und am Arbeitsplatz. Selbst die Einschleppung für uns fast vergessener Krankheiten wie Aussatz und Pocken ist durch die Entwicklung schneller Verkehrsmittel, dem damit verbundenen Näherrücken ganzer Völker und durch das Arbeiten von Gastarbeitern bei uns möglich geworden. Schon mehrmals haben sich darüber beunruhigende Pressemeldungen geäußert (3 u. 55).

Um all diesen besonders gefährlich verlaufenden Krankheiten vorzubeugen oder ihre Ausbreitung auf weitere Bevölkerungskreise zu verhindern, müssen oft sehr aufwendige Maßnahmen ergriffen werden. Von den bis heute zur Anwendung gelangenden Desinfektionsverfahren sind die physikalischen Methoden im allgemeinen zeitraubend und umständlich oder auch unzureichend. Sowohl für den Klinikbetrieb als auch für die Praxis haben daher in zunehmendem Maße die chemischen Desinfektionsmittel an Bedeutung gewonnen. Jedoch hat die chemische Desinfektion nicht in ausreichendem Maße allen Anforderungen genügen können. Die keimtötende Wirksamkeit der verschiedenen Desinfizientien ist auf bestimmte Keimarten beschränkt, an vielen Objekten ungenügend oder wegen ungünstiger Einflüsse nicht anwendbar oder wird gar durch Beimengung organischer Substanzen wie Blut und Eiter aufgehoben.

Praktisch werden heute meist Mittel auf Phenol- oder Formaldehyd-Basis verwandt; sie haben oft den Nachteil der Geruchsbelästigung, Hautunverträglichkeit oder ungenügender Wirkung an der Fläche und benötigen oft allzu lange Einwirkzeiten. So wird verständlich, daß immer wieder neue Mittel für diese Aufgabe geprüft werden.

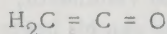
Nachdem Hartman, LoGrippo und Kelly bereits seit 1951 im amerikanischen Schrifttum auf die keimtötende Wirksamkeit von Beta-Propiolak-

ton in Blut, Plasma und Transplantationsmaterial hingewiesen haben, und Hoffman und Warshowsky (1958) sowie Gillissen (1960) Beta-Propiolakton für Desinfektionsaufgaben prüften, stellten wir es uns zur Aufgabe, diese Substanz in wässrigen Lösungen zur Desinfektion von Wäsche und Flächen zu prüfen. In orientierenden Voruntersuchungen testeten wir seine wachstumshemmenden und keimtötenden Eigenschaften gegen Bakterien, Pilze und Bakteriensporen.

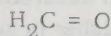
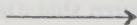
II. PHYSIKALISCHE UND CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN VON BETA-PROPIOLAKTON (BPL)

Beta-Propiolakton ist bereits seit 1885 durch Beckurts und Otto als chemische Substanz bekannt. Seine Synthese gelang erstmals 1915 durch Johannson, der es aus dem Silbersalz der β -Jod-Propionsäure synthetisierte und einige hydrolytische Reaktionen mit Säuren und Basen beschrieb (40). Jedoch erst mit der Entdeckung einer einfacheren Synthese von BPL aus Keten und Formaldehyd durch Kung (1941) kam diese Substanz zu wichtiger Bedeutung (54).

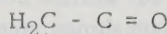
Keten



+



Formaldehyd



β -Propiolakton

Diese Verbindung ist die Muttersubstanz der Acrylsäure, die durch die Polymerisate ihrer Esterverbindungen - Methyl-, Propyl-, Butylacrylate und anderer Derivate - seither für die Herstellung von Kunstharzen große industrielle Bedeutung gewonnen hat (56).

Bleiben wir zunächst bei den physikalischen und chemischen Eigenschaften von BPL, weil sie z.T. auch bedeutsam für die Anwendung als Desinfektionsmittel sind und einen Einblick in die große Reaktionsbereitschaft der Substanz geben. Genauere Untersuchungen über das chemische und physikalische Verhalten von BPL wurden vor allem von Gresham und Mitarbeitern (13-25) sowie Bartlett und Mitarbeitern (1-2) unternommen.

BPL ist eine farblose, leicht visköse Flüssigkeit von leicht süßlichem und stecherdem Geruch.

Spezifisches Gewicht	1,149
Gefrierpunkt	- 33,4°C
Siedepunkt	155°C
Entzündungstemperatur	74°C
Wasserlöslichkeit bei 25°C	37,5 Vol%
Dampfdruck bei 25°C	3,4 mm Hg

BPL ist bei Konzentrationen, die unter normalen atmosphärischen Bedingungen auftreten können, nicht brennbar. Man schätzt, daß erst bei 2 Vol% in der Luft ein brennbares Gemisch entsteht. Bei 30°C beträgt die Konzentration in der Luft an der Sättigungsgrenze nur 0,6 Vol%. Die Abhängigkeit des Dampfdruckes von BPL von der Temperatur zeigt folgende Aufstellung (36):

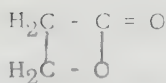
Tabelle 1
Der Dampfdruck von Beta-Propiolakton

Temperatur	°Celsius:	30°	70°	90°
Konzentration von BPL in gesättigtem Dampf	mg/l :	10	100	300

In konzentrierter Form ist BPL bei Temperaturen bis zu 4°C stabil. Bei höheren Lagerungstemperaturen, z.B. 54°C, unterzieht es sich der Polymerisation zu einem festen Körper binnen 6 bis 8 Wochen. Bei 150°C polymerisiert die Substanz in reiner Form innerhalb weniger Stunden (13). Durch geeignete Katalysatoren kann diese Polymerisationsneigung noch gesteigert werden. Besonders eignen sich hierfür Säuren, Basen und Salze, vor allem Metallsalze wie Eisen- und Zinnchlorid. In ihrer Anwesenheit kann die Reaktion auch bei Zimmertemperaturen stark exotherm, ja sogar explosiv erfolgen. Weniger heftig sind die Reaktionen mit Natriumchlorid, Calciumchlorid und Essigsäure. Die Endprodukte der Polymerisation mit oder ohne Katalysatoren sind ähnlich. Es handelt sich um Polyestersäuren, die je nach Polymerisationsgrad farblos-viskose Öle oder weiße feste Massen darstellen (Formel II). Nach Kelly geht in wässriger Lösung der erste Schritt zur Bildung der Polymerisate über die Hydracrylsäure (III), die sich dann mit weiteren BPL-Molekülen zu Polymeren der Hydracrylsäure verbindet (II, R = IIb). Die Polymerisation in Wasser ist abhängig von den molaren Mengenverhältnissen. Der Abbau der Polymeren erfolgt unter Einwirkung von kochenden wässrigen Alkalien zu Salzen der Hydracrylsäure durch Hydrolyse (III). Durch Alkoholbehandlung unter Zusatz eines Säurekatalysators erhält man in fast vollständiger Umwandlung

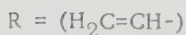
Hydracryl-Ester (IV). Bei der Hitzezersetzung (Pyrolyse) mit 150°C werden die Polyestersäuren schnell und vollständig zu Acrylsäure abgebaut (V).

Formal I - V



(I)

β-Propiolakton

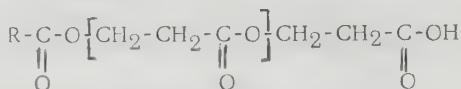


II a. vinyl-Gruppe

oder

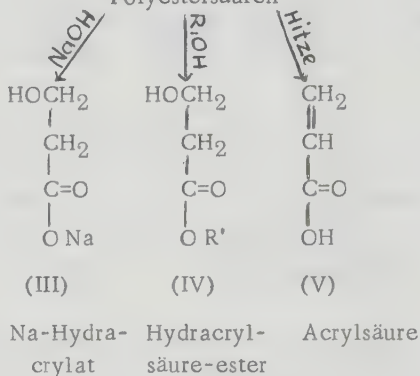


II b. β-hydroxyaethyl-Gruppe



(II)

Polyestersäuren



Die Hydrolyse von BPL ist auch wie die Polymerisation eine Funktion der Temperatur. Hoffman und Mitarbeiter bestimmten die Hydrolyserate in Abhängigkeit von der Temperatur als die Halbwertszeit, die Zeit, die BPL benötigt, um auf 50% der Ausgangskonzentration abzubauen (Tabelle 2) (36).

Tabelle 2
Hydrolyse-Rate von Beta-Propiolakton

Temperatur °C	Halbwertszeit/min
10	1080
25	210
50	20
75	5

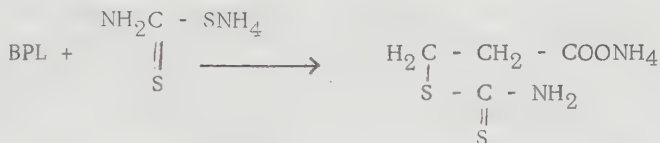
Die Reaktionen von BPL mit Salzen anorganischer Säuren in wässrigen Lösungen ergeben als primäre Reaktionsprodukte Salze der β-substituierten Propion-

säure und in manchen Fällen als sekundäres Reaktionsprodukt Salze von Polyesterensäuren

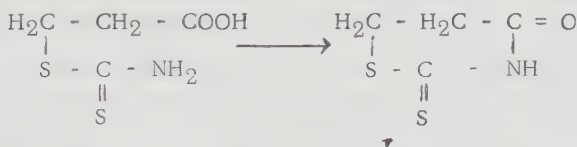


und außerdem einen beträchtlichen Teil von Natrium- β -(β -chlorpropionyxy)-propionat und höheren Analogen (14): $\text{ClCH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COONa}$, Na- β -(β -chlorpropionyxy)-propionat.

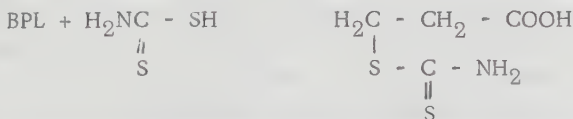
Ähnliche Verbindungen wie die obigen entstehen auch bei Reaktionen von BPL mit Dithiocarbaminsäuren, ihren Salzen und Thioharnstoff. Mit Ammoniumdithiocarbamid reagiert BPL zu Ammonium- β -Dithiocarbaminpropionat (15).



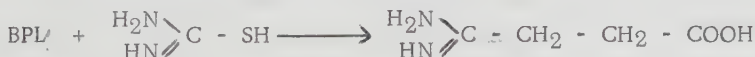
In einigen Fällen kommt es zur Bildung ringförmiger 1,3 substituerter Thiazane durch Ringbildung der dem obigen Ammoniumsalz entsprechenden Säure:



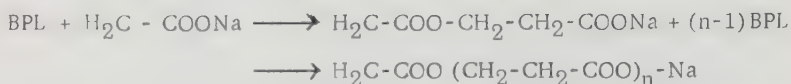
Ebenso bildet sich in wässrigen Lösungen aus BPL und Dithiocarbaminsäure β -Dithiocarbaminpropionsäure:



Mit Thioharnstoff bildet BPL β -Isothioureidopropionsäure:



In Reaktionen von BPL mit Salzen von Karbonsäuren wie Natriumacetat bilden sich Salze der β -Acetoxipropionsäure und Polyestersäure.



Beim atmosphärischen Druck wird die β -Acetopropionsäure vollständig zu Essigsäure und Acrylsäure destilliert.



Je nach dem molaren Mengenverhältnis der beiden reagierenden Substanzen überwiegt die Bildung der Polyestersäure. Ähnliche Substanzen werden auch durch Salze anderer Oxycarbonsäuren gebildet, wie z.B. durch Natriumcaprat, die dann viskose Öle darstellen (16). Die Reaktionen mit Alkohol ergeben je nach Art des Katalysators zwei verschiedene Substanzen. Mit basischen Katalysatoren ist die Reaktion besonders bei primären Alkoholen schnell und ergibt Hydracrylsalze. Ist der Alkohol nicht in reichlichem Überschuß vorhanden, so bilden sich auch Polymere, die Ester der Polyhydracrylsäure (IV) darstellen.

Mit sekundären Alkoholen ist der Polymerisationsgrad noch hoher, da die Reaktion zu Hydracrylsalzen etwas langsamer verläuft. Ohne zugeführte Katalysatoren oder mit nur sauren Katalysatoren sind die Reaktionen von BPL in Alkohol wesentlich langsamer und ergeben β -Alkoxysäuren. Wichtig für die Reaktionen sind Konzentration der Katalysatoren, Temperatur, die Zeit und der molare Überschuß von Alkohol (17):

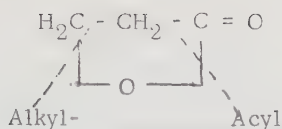


Mit Phenol reagiert BPL zu β -Phenoxypropionsäure



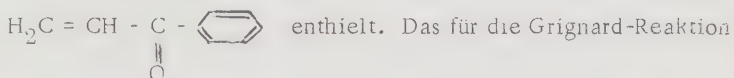
zum Teil werden auch Polymere von BPL gebildet, die bei hohen Temperaturen (150°) sogar vorwiegend entstehen. In Gegenwart von Schwefelsäure als Katalysator erhält die Reaktion von BPL mit Phenol einen auffallenden Wandel, indem schnell und in großer Menge Phenylhydracrylat gebildet wird. Mit Thiophenol reagiert BPL noch viel schneller, und der Ertrag der β -substituierten Propionsäure ist noch höher. In fast gleichem Maße gilt das auch für das Natrium Salz (18).

Die bisher aufgeführten Reaktionen zeigen, mit welcher Leichtigkeit die Ringöffnung von BPL sich an der Acyloxygen- oder Alkyloxygenbindung vollzieht.



Es wurde auch gezeigt, daß die Polymerisation in vielen Fällen als konkurrierende Reaktion nebenhergeht.

In weiteren Untersuchungen studierten die Autoren auch die Reaktionen, die sich an der Carbonylgruppe ($\text{C}=\text{O}$) abspielen, wie dies bei Reaktionen mit Grignard-Verbindungen der Fall ist. Ein Zusatz von Phenylmagnesiumbromid ergab ein Gemisch aus Produkten, das zum größten Teil aus β -Bromopropionsäure bestand, während der neutrale Anteil dieser Mischung Phenyl-Vinyl-Keton



enthielt. Das für die Grignard-Reaktion zu erwartende β -Hydroxypropio-phenon war wahrscheinlich zu instabil, um es nachweisen zu können.

Wie diese, so ergeben auch andere Reaktionen mit Grignard-Reagenzien Mischungen von β -Halogenpropionsäure (19). Auch die Reaktionen mit organischen und anorganischen Säuren und Anhydriden haben wieder β -substituierte Propionsäuren zur Folge, wobei aus Halogensäure mit BPL β -Halogenpropionsäure entsteht (20).



Es sind also zwei chemische Vorgänge, die sich bei den bisherigen Reaktionen abspielen können: der hydrolytische Abbau der Substanz zu Acrylsäure, Hydracrylsäure und den β -substituierten Propionsäuren mit ihren dazugehörigen Salzen einerseits und andererseits in fast stetiger Konkurrenz zur Hydrolyse die Polymerisation. Die Richtung der Reaktionen ist abhängig von der Temperatur, den Katalysatoren, der Zeit, in der die Reaktionen ablaufen und dem molaren Mengenverhältnis der reagierenden Substanzen. Kelly zeigte, daß das Ausmaß der Polymeren-Bildung in direktem Verhältnis zu der BPL-Konzentration steht. Nur Lösungen, die um mehr als 1 g% verdünnt sind - wobei 1 Mol BPL mit mehr als 390 Molen H_2O reagiert - sind im wesentlichen frei von Polymeren (Abb.1) (49).

Sie wies ebenfalls nach, daß die Hydrolyse in Plasma schneller abläuft als in wässrigen Lösungen, da BPL sofort mit Hydroxyl-, Carboxyl-, Sulphydryl-, Amino- und Phenolgruppen reagiert, die an Proteine gebunden sind (Abb.2).

Die schnelle Reaktionsbereitschaft von BPL ist Ausdruck der chemischen Eigenschaften eines β -Laktons im allgemeinen. Nach der Spannungslehre von A. von Baeyer, die von der van 't Hoff'schen Vorstellung ausgeht, daß die Valenzen eines Kohlenstoffatoms nach den Ecken eines regulären Tetraeders gerichtet sind und in der Normallage einen stets gleichbleibenden Tetraederwinkel von $109^{\circ} 28'$ bilden, bedarf es im Gegensatz zu den 5- und 6-gliedrigen Zyklparaffinen, die leicht herstellbar sind und sich durch Beständigkeit und Reaktionsträgheit auszeichnen, bei 3- und 4-gliedrigen Ringsystemen einer Zusammenpressung der Tetraederwinkel. Dadurch gelangt das Molekül in einen Spannungszustand, der die große Reaktionsfähigkeit erklärt (11). Die Reaktionsfreudigkeit mit organischen Verbindungen kommt der Bedeutung dieses Mittels zur Sterilisation von biologischem Material zugute.

III. DIE ANTIMIKROBIELEEN EIGENSCHAFTEN VON BETA-PROPIOLAKTON (BPL)

wurden 1951 entdeckt und fanden bisher vor allem in der amerikanischen Literatur ihren Niederschlag. BPL hatte bei routinemäßigen Untersuchungen an ca. 700 verschiedenen Verbindungen, die durch Hartman, LoGrippe u. Kelly und Mitarbeitern durchgeführt wurden, für ihr Anwendungsgebiet - Sterilisation von Blut, Plasma, Transplantaten sowie der Vaccinebereitung - als brauchbar erwiesen (25-31, 58-72, 43-49). Speziell mit der Sterilisierung von Transplantaten beschäftigten sich noch Szilagyi und Mitarbeiter (88-90), Trafas und Mitarbeiter (92) sowie Rains und Mitarbeiter (81). Auf dem Gebiet der Vaccinebereitung arbeiteten besonders Peck und Powell und Mitarbeiter (77-89), Polley und Guerin (78-79), Mack und Chotisen (73, 74), sowie Lépine und Mitarbeiter in Frankreich (56, 57). Da es sich bei diesen Autoren hauptsächlich um Transfusionsfachleute und Immunbiologen handelt, war es verständlich, daß sie

1. Beta-Propiolakton (BPL) zur Sterilisation von Blut, Plasma, Transplantaten sowie zur Vaccinebereitung

testeten. Es waren neben der keimtötenden Wirkung von BPL besonders die biochemischen Eigenschaften, wie fehlende Eiweißdenaturierung, geringere Beeinflussung der Blut- und Gewebsproteine sowie die Erhaltung der Antigenwirkung, die zu weiteren Untersuchungen auf diesem Gebiet ermutigten. Da

Abbildung 1

Der Effekt der BPL-Konzentration auf das Ausmaß der Bildung von
Hydracrylsäure-Polymeren, die während der Hydrolyse entstehen
(nach Kelly)

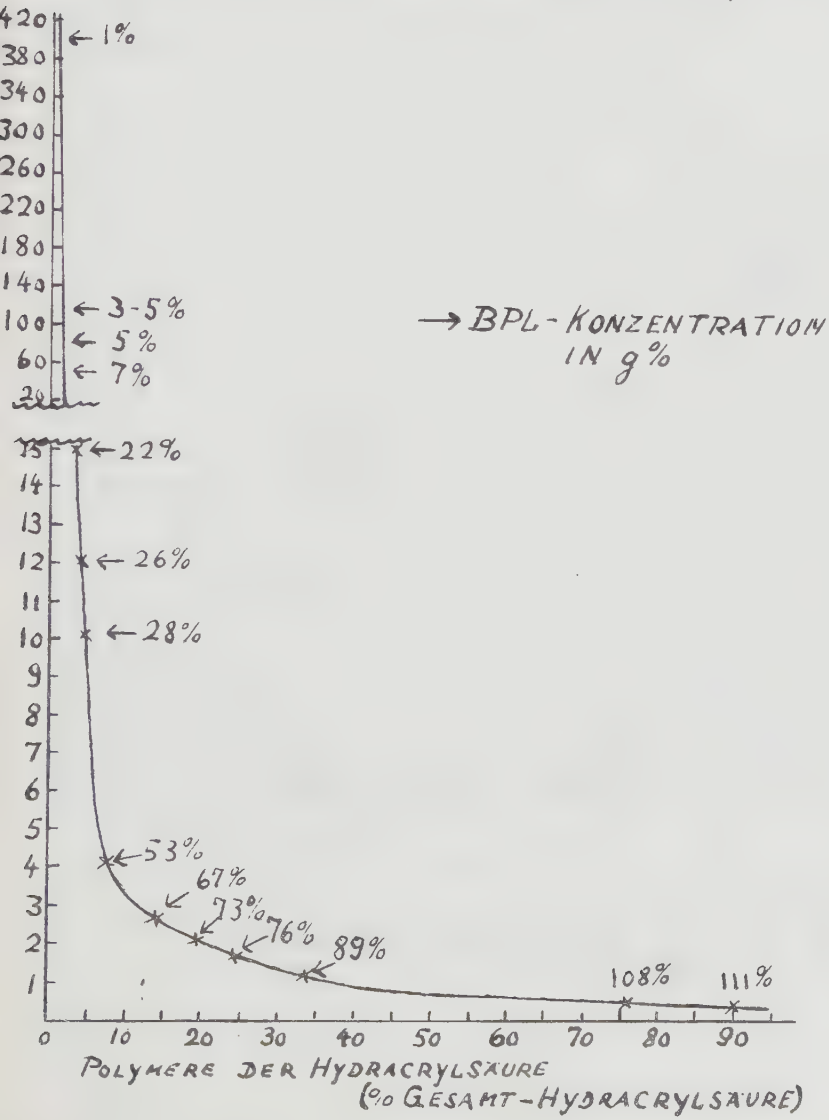
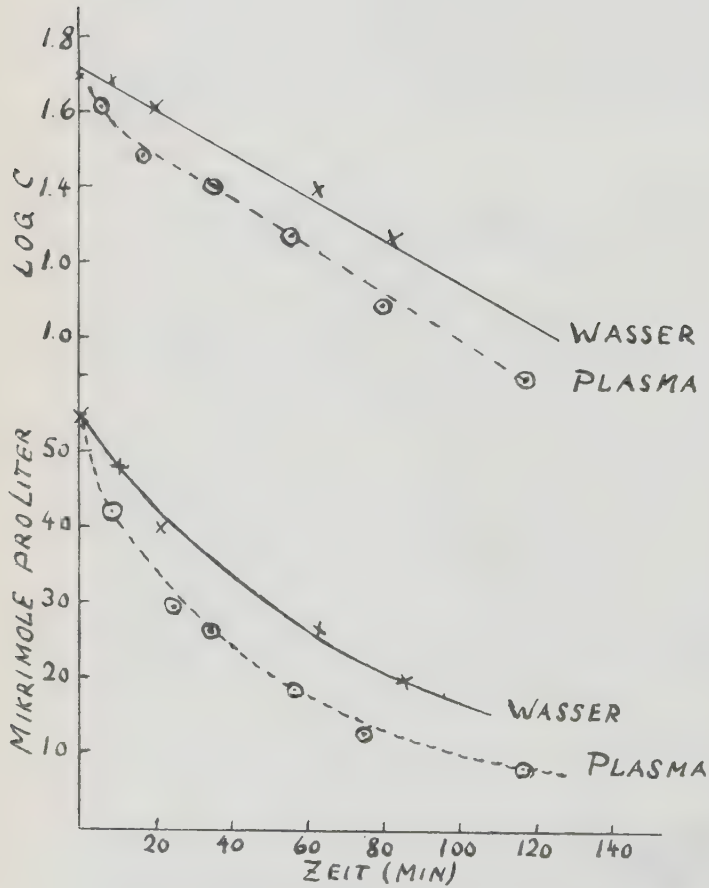


Abbildung 2

Die Hydrolyserate von BPL in Wasser und Plasma bei 37°C
(nach Kelly)



bei Transfusionen die Gefahr einer Inokulierung von Hepatitis-Viren immer sehr groß ist, lag es nahe, vor allem

a) die Inaktivierung von Viren durch Beta-Propiolakton (BPL)

in den genannten Medien zu untersuchen. In den seit über einem Jahrzehnt verlaufenden Untersuchungen wurde die Wirksamkeit von BPL gegen eine Vielzahl im Laboratorium gezüchteter Viren getestet. Da Hepatitis-Viren nicht verfügbar waren, wurden besonders resistente Stämme ausgesucht.

Es waren dies besonders Viren der New Jersey Vesicular Stomatitis (NJVS), St. Louis Encephalitis (SLE), Venezuelan Equine Encephalomyelitis (VEE), Newcastle Disease (ND), Poliomyelitis, Tollwut, Encephalomyocarditis (EM), Pocken, Mumps, des Columbia SK-Stammes der Murine Encephalitis, der Psittakose und des Gelbfiebers; besonders ausgedehnte Untersuchungen wurden mit den Viren der lymphozytären Choriomeningitis (LCM), dem MM-Stamm der Encephalomyocarditis (MM) und den Eastern Equine Encephalomyelitis - (EEE) Viren gemacht.

Letztere hatten sich in Vergleichsuntersuchungen als besonders resistent gegenüber anderen Desinfizienten verschiedener chemischer Herkunft ergeben und erforderten auch bei der Abtötung durch BPL z.T. höhere Dosen.

Allgemein lagen in 90%igem ACD-Plasma die viruciden Konzentrationen für BPL gegenüber den genannten Keimen zwischen 0,05 bis 0,35% (Gew.%). Die Abtötung wurde bei 37°C nach einer Inkubation von 1 bis 2 Stunden erreicht. Temperaturen zwischen 24 bis 27°C verursachten eine Verlängerung der Einwirkzeit auf 7 bis 12 Stunden und bei 5-10°C auf 12 bis 24 Stunden, in Analogie zu der in Abhängigkeit von der Temperatur verringerten Hydrolyserate.

Bei der Sterilisation von Vollblut waren jedoch höhere Dosen zur Entkeimung notwendig. Hartman, Logrippo und Mitarbeiter (30, 63) wiesen nach, daß dies durch den erhöhten Eiweißgehalt bedingt ist. So wurden an künstlich und natürlich infiziertem Plasma, Erythrozytensuspensionen und Vollblut folgende BPL-Konzentrationen zur Abtötung von LCM-, MM- und EEE-Viren ermittelt (20) (Tabelle 3):

Tabelle 3

Beta-Propiolakton-Konzentration zur Abtötung von Viren

Virus	bei natürl. Virämie			künstlich infiziertes		
	Vollblut	Ery.- Susp.	Plasma	Vollblut	Ery.- Susp.	Plasma
LCM	2000	1500	400	2000	-	500
MM	3000	1500	1000	3000	1500	1500
EEE	4000	1500	2000	4000	2500	3000

Da bei Konzentrationen über 0,15% bereits deutliche Hämolyse auftritt, mußten andere Wege zur Vollblutsterilisation eingeschlagen werden. Eine Möglichkeit bestand in der getrennten Sterilisation von Plasma und Erythrozyten.

Nebenwirkungen auf die Plasmaproteine wurden nämlich erst bei Konzentrationen um 0,45% BPL beobachtet. Bei Verwendung anderer Konservierungslosungen wie CDL- (Citrat-Dextrose-Laktose) anstatt der ACD-Lösung konnte man in Erythrozytensuspensionen auch eine Konzentration von 0,25% tolerieren, ohne daß eine gesteigerte Hämolyse auftrat. Eine weitere Möglichkeit, höhere BPL-Konzentrationen auf die Erythrozyten einwirken zu lassen, bestand darin, daß man die Erythrozyten aus der 0,4% igen BPL-Lösung vor Erreichen der Halbwertszeit der Hydrolyse herausnahm. Der Anteil saurer Abbauprodukte aus der Hydrolyse von BPL ist zu diesem Zeitpunkt noch so gering, daß eine Schädigung daraus für die roten Blutzellen nicht entstehen kann, andererseits aber die viruzide Wirksamkeit von BPL schon ausreichend ausgenutzt wurde (63).

Aussichtsreicher und einfacher erscheint auch die seit langem gehandhabte Methode einer kombinierten Behandlung von Plasma und Vollblut mit BPL und UV-Bestrahlung, eine Kombination, die sich nach vergleichender Untersuchung mit anderen Desinfektionsmethoden als am günstigsten herausgestellt hatte (s. unten).

Zur Sterilisation von Serum für Gewebekulturen (68, 69) wurde BPL 0,5% ig angewandt. Man durfte das so entkeimte Serum jedoch nur 10% ig im Wachstumsmedium verwenden, um keine Entwicklungsstörungen in den Kulturen zu erreichen. Einen wesentlichen Vorzug hat man in der Anwendung von BPL auf dem Gebiet der Vaccinebereitung gesehen. LoGrippe stellte Vaccine von EEE-, MM- und Tollwut-Viren her. Die Erreger waren mit 0,2% igen BPL-

Lösungen in 10 bis 15 Min. bei 37°C inaktiviert, während Phenol und Formalin Tage dafür benötigten (57, 60, 66). Mack und Chotisen stellten eine ND-Virus-Vaccine mit 0,02%iger BPL-Lösung her, Lépine verwandte 0,1%ige Lösungen. Sie erreichten dabei einen hohen Antigentiter, der sich durch den Nachweis protektiver Antikörper bei Hühnern bereits nach 16 Tagen bemerkbar machte und ansteigende Tendenzen zeigte. Ausreichende Antigeneffekte wurden selbst dann noch in den Vaccinen erreicht, wenn die 2- bis 4-fache Dosis der geringsten viruziden Wirkung von BPL angewandt wurde (60). Die langwierige Methode mit Formalin und Phenol nach Salik hatte einen 50%igen Antigenverlust bei Poliovaccinen zur Folge (57).

b) Die Abtötung von Bakterien, Pilzen und Sporen mit Beta-Propiolakton (BPL) wurde ebenfalls erfolgreich an organischem Material durchgeführt. Hartman und Mitarbeiter sterilisierten 90% ACD-Schafserum mit BPL, in dem u.a. *A.aerogenes*, *E.coli*, *S.typhosa*, *M.aureus*, *Sar.lutea* und *Ps.aeruginosa* in einer Konzentration von 5×10^7 pro ml vorhanden waren. Die bakterizide Konzentration betrug 0,2% (26). Husmann konnte mit gleicher Konzentration in Serum *M.aureus* hämolyticus var. SG 511 und *E.coli* innerhalb 6 Stunden abtöten, während für *Bac. subtilis* eine Konzentration von 0,5% bereits nach 60 Minuten wirksam war. SG 511 und *E.coli* waren bei dieser Konzentration bereits nach 30 Minuten abgetötet (37). Szilagyi und Mitarbeiter, die BPL zur Sterilisation von Transplantationsmaterial (Haut, Arterien, Knochen, Knorpel) anwandten, erzielten mit 0,75%igen Lösungen nach 2 Stunden Einwirkzeit und 37°C Inkubation bereits eine Entkeimung des bis zu 8 Stunden post mortem entnommenen Autopsiematerials. Sie erhöhten jedoch aus Sicherheitsgründen die Konzentration auf 1%, unbeschadet der biochemischen und physikalischen Eigenschaften der Gewebe. Kulturelle Untersuchungen ergaben, daß auf diese Weise *M.aureus* und *albus*, *Ps.aeruginosa*, *A.aerogenes*, verschiedene Colitypen, *Bac.subtilis* sowie hämolysierende und nicht-hämolysierende Streptokokken und verschiedene Hefepilze abgetötet wurden (88).

Von Kiel (1960) prüfte die Wirkung von BPL in 20%igem Serum gegen einige oben erwähnte Keime und erzielte mit 1%igen Lösungen nach 30 Minuten eine Abtötung. Unterschiedliche Ergebnisse hatte sie bei *E.coli*, die nach 60 Minuten noch nicht abgetötet sein sollen. Eine starke Empfindlichkeit zeigten Pilze gegenüber BPL. *Trichophyton pedis* Kaufmann-Wolf, Pilzstamm 5 und 6 waren nach 30 Minuten mit 1%igen Lösungen inaktiviert (50).

Da nicht in jedem Fall die Versuche mit Viren und Bakterien in Plasma, Vollblut und Vaccinen reproduzierbar waren, sondern bei genauen Kontrollen vor allem bei Viren gelegentlich Spuren entwicklungsfähiger Keime entdeckt wurden, wurde die BPL-Konzentration im Plasma auf 0,4 bis 0,6% erhöht. Das hat jedoch nachteilige Auswirkungen auf die Plasmaproteine. Es zeigte sich, daß auch keinesfalls durch einfache Verdoppelung der Dosen die letzten Spuren zu beseitigen waren, da sich die Abtötungsrate nicht direkt proportional zur Dosierung verhält. Diese Erscheinung wird in der Literatur als "tailing-effect" bezeichnet. Um diesem Umstand zu begegnen und auch die Konzentration von BPL senken zu können, wurden

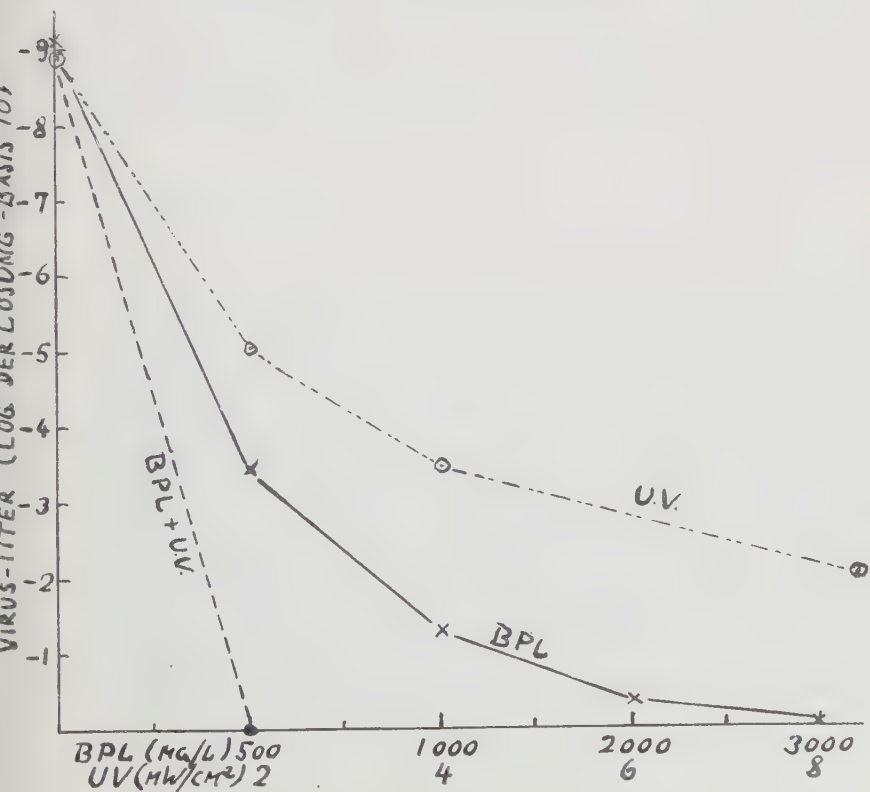
c. kombinierte Sterilisationsverfahren mit Beta-Propiolakton (BPL)

in Erwägung gezogen. Bei den orientierenden Voruntersuchungen hatten sich noch verschiedene andere Chemikalien als wirksam gegen Viren und Bakterien erwiesen. Die Kombination von BPL mit Nitro- und Schwefel-Senfohlen, Äthylenoxyd, photodynamisch wirkenden Farbstoffen, Iminen, Formalin und anderen ergaben jedoch nicht mehr als einen Summationseffekt. Um eine wirkliche Dosisreduzierung zu erreichen, war ein mehr synergistisch wirkender, im Idealfall potenzierender Desinfektionseffekt notwendig. Es stellte sich die zusätzliche UV-Bestrahlung als sehr günstig heraus. Hartman und Logripp o stellten fest, daß sich durch diese physiko-chemische Desinfektionsmethode die Dosen für BPL um 1/4 bis 1/6 und die Strahlenmenge um 1/3 bis 1/4 reduzieren lassen.

Für die Standardbehandlung von Plasma hat sich eine BPL-Konzentration von 0,35% mit zusätzlicher UV-Bestrahlung als sicherste Methode erwiesen. Viele hundert Plasmatransfusionen, die von 1951 bis 1956 ohne und seit 1956 mit der UV-Bestrahlung durchgeführt wurden, haben nie einen Fall von homologem Serumikterus zur Folge gehabt. Allerdings stehen zur sicheren Beweisführung einer viruziden Wirkung auf Hepatitis-Viren mit der physiko-chemischen Kombinationsmethode noch Versuche aus, die an freiwilligen Versuchspersonen mit sicher mit Hepatitis-Viren infiziertem Plasma gemacht wurden. Während BPL und UV-Licht getrennt angewandt sehr hohe Dosen zur Virusinaktivierung benötigen, wie dies aus nachfolgender Abbildung hervorgeht, um besonders die letzten Spuren von Viren zu erfassen, d.h. den "tailing effect" auszumerzen, führt die Kombination beider Mittel zu schneller und sicherer viruzider Wirkung (Abb.3).

Man geht bei dieser Methode so vor, daß man auf die Medien erst BPL bei niedrigen Temperaturen einwirken läßt (6 bis 9°), in 0,35%iger Lösung, und

Abbildung 3
 "Tailing effect" bei getrennter Anwendung von BPL und UV-Strahlen und
 viruzide Wirkung durch kombinierte BPL/UV-Sterilisation
 (nach Hartman und LoGrippo)



nach 1 Stunde mit der Bestrahlung beginnt. In dieser Zeit sind erst 10 bis 20% des Desinfektionsmittels zur Wirkung gekommen. Nach der Bestrahlung und Erwärmung auf 37°C können dann die restlichen 70 bis 80% BPL schnell zur Einwirkung kommen. Als letzte Maßnahme ist dann nur noch die Einregulierung des pH-Wertes zwischen 6,8 und 7,4 mit NaOH nötig, da BPL während der Hydrolyse zu sauren Abbauprodukten den pH-Wert senkt (33).

Nachdem in ausreichendem Maße die keimtötende Wirksamkeit von BPL in organischem Material nachgewiesen worden war, wurde auch

2. die Brauchbarkeit von Beta-Propiolakton (BPL) für Desinfektionsaufgaben

geprüft. Hoffman und Warshowsky (1958) sahen in dem weiten Wirkungsspektrum von BPL und in seinem chemischen Verhalten gewisse Ähnlichkeiten mit Formaldehyd und Äthylenoxyd, Substanzen, die auch häufig zur Raumesinfektion benutzt werden. Bei dieser spielt nicht nur die Desinfektion von Flächen des Raumes und darin befindlicher Gegenstände sowie von Stoffen eine Rolle, sondern auch die Verhütung einer Ausbreitung von Mikroorganismen auf dem Luftwege, die zur sogenannten "air-borne-infection" führt. Die genannten Autoren, Dawson und Mitarbeiter, Feazel und Lang, Spinner und Hoffman, Bruch und Husmann untersuchten

a) die Anwendung von Beta-Propiolakton (BPL) in der Dampfphase und als Aerosol.

Die grundlegende Methodik dieses Desinfektionsverfahrens wurde von Hoffman und Warshowsky bearbeitet (36). Dabei war zunächst bedeutsam, daß BPL in der Dampfphase unter normalen atmosphärischen Bedingungen und auch höheren Zimmertemperaturen sowie bei den angewandten Konzentrationen nicht brennbar ist (s. Abschnitt II). Ferner wiesen sie darauf hin, daß die keimtötende Wirksamkeit von BPL-Dampf eine Funktion der Konzentration, relativen Luftfeuchtigkeit des Raumes und der Temperatur ist, worauf später noch eingegangen wird (III/3). Sie zeigten in allgemeinen Versuchen und in der praktischen Anwendung die bakterizide und sporozide Wirkung von BPL in der Dampfphase und erzielten eine Abtötung von *M. aureus* und *Bac. subtilis* var. *nigar*-Sporen bei einer Konzentration von 5 mg/l Luft im geschlossenen Raum, einer Temperatur von 25°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80%.

Die sporozide und tuberkulozide Wirkung wurde auch an *Bac. anthracis*- und

Clostridium sporogenes-Sporen sowie an *M. tuberculosis* nachgewiesen (86). Husmann prüfte die bakterizide Wirksamkeit von BPL als Aerosol an Linsenflächen, die mit 8-stündigen Bouillonkulturen von *M. pyogenes* var. *albus* und *aureus* SG 511 und *E. coli* infiziert worden waren sowie in der Raumluft durch Erzeugung eines künstlichen Keimaerosols. Er ermittelte als bereits keimtötende Konzentration 0,5 mg BPL/l Luft, wobei *E. coli* schon nach 15 Minuten, und die Mikrokokken nach 30 Minuten abgetötet waren. In gleichartigen Versuchen konnte er auch die viruzide Wirkung an T₃-Coliphagen bei gleicher Konzentration und 30 Minuten Einwirkzeit bestätigen (39). Besonders hoch war die fungizide Wirkung gegen *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Penicillium* und *Trichophyton pedis* (Kaufmann-Wolf), die bei 0,5 mg BPL/l Luft schon in 5 Minuten abgetötet waren (40). Dawson und Mitarbeiter benötigten zwar in ihren Untersuchungen an Venezuelan Equine Encephalomyelitis-(VEE-) Viren an Baumwolläppchen und Filterpapier höhere Konzentrationen, 2-4 mg BPL/l Luft bei 15 Minuten Einwirkzeit (16), konnten aber später zeigen, daß bereits bei einer Dosis von 1,0 mg/l Luft Pocken-, Gelbfieber- und Psittakose-Viren sowie eine Rickettsie, *Coxiella burnetii*, in ebenfalls 15 Minuten abgetötet sind. Diese Wirkung ergab sich sowohl an Keimträgern, die mit hochtitrigen Virussuspensionen infiziert waren (sog. feuchte Viren) als auch an solchen Keimunterlagen, die mit einem Keimaerosol (sog. trockene Viren) behandelt wurden. Nach diesen Ergebnissen sind die Autoren der Ansicht, daß BPL in der Dampfphase eine allgemeine viruzide Wirkung besitzt, da die untersuchten Viren sich in ihrer Morphologie, Pathogenität und relativen Stabilität unterscheiden und folgenden 4 Hauptgruppen angehören:

1. Neurotrope - (VEE-),
2. Dermatotrope - (Pocken-),
3. Viszerotrope - (Gelbfieber-) und
4. Pneumotrope - (Psittakose-) Viren (7).

Für die praktische Anwendung von BPL zur Raumdesinfektion wird für eine optimale Wirksamkeit eine Temperatur von 24°C, eine relative Luftfeuchtigkeit von mindestens 70% und je nach dem Vorhandensein adsorptiv wirkender Stoffe im Raum eine initiale BPL-Konzentration von 2 bis 4 mg/l Luft sowie eine Einwirkzeit bis zu 2 Stunden empfohlen (86).

Einige Beispiele mögen die eindrucksvollen Desinfektionsergebnisse wiedergeben: Es wurde eine 2-stöckige Militärbaracke mit einem Rauminhalt von 1420 m³ desinfiziert, in dem auch 55 aufgestellte Kontrollen mit *Bac. subtilis*-Sporen steril waren (36). Woodward berichtet über die Desinfektion eines ganzen Krankenhaustraktes (2520 m³) mit Schlafzimmern, Küche, Arzt- und

Röntgenzimmern, Operations- und Vorbereitungsräumen einschließlich Möbeln, Op.-Instrumentarium, Röntgen- und Fernsehgerät u.v.a. (95). Nach Untersuchungen von Bruch wurden in einem Krankenhaus mit Staphylokokken-Hospitalismus Operations-Saal, Verbandsraum und Frühgeburtenzimmer, ferner eine Wöchnerinnen-Station mit 136 Zimmern und ein Labor, in dem Virus-Vaccine hergestellt wurden, erfolgreich sterilisiert. Proben von *Bac. subtilis* var. *niger*- und *Bac. thermophilus*-Sporen (ca. 100 000/Teststreifen) sowie Abstriche von verschiedenen Gegenständen waren nach der Desinfektion steril (5). Nach einer einfachen Entlüftung durch Fenster und Türen waren die Räume bereits nach 24 Stunden wieder bezugsfähig. Es bestand keinerlei Geruchswahrnehmung mehr. Bei sachgemäßer Anwendung und richtigem Funktionieren der Aerosol-Geräte traten auch keine Beschädigungen oder Niederschlagsbildungen auf. Bei einem Vergleich mit Formaldehyd und Äthylenoxyd kamen die Autoren zu dem Schluß, daß BPL gegen bakterielle Sporen 25 mal wirksamer ist als Formaldehyd und 4000 mal wirksamer als Äthylenoxyd. Letzteres kann es zwar nicht wegen seiner guten Durchdringungsfähigkeit ersetzen, gegenüber Formaldehyd bedarf es auch einer höheren relativen Luftfeuchtigkeit, was jedoch kein eigentliches Problem darstellt, da mit den Aerosol-Geräten gleichzeitig genügend Wasser versprüht werden kann. Im übrigen ist BPL jedoch auch - im Gegensatz zu Formaldehyd - bei niedrigen Temperaturen, z.B. 10°C, wirksam und hat nicht dessen unliebsame Eigenschaften, wie starke Haftfähigkeit durch Oberflächenkondensation und Polymerisation zu Paraldehyd, lange Entlüftungszeit und Neutralisation mit Ammoniak (5, 10, 36 u. 39).

b) Die Desinfektion mit Beta-Propiolakton (BPL) in Lösung

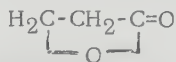
wurde durch Gillissen 1960 erstmals untersucht. Er prüfte die tuberkulozide Wirkung von BPL in frischem, tuberkelbakterienhaltigem Sputum, welches in Wäschestoff eingedrungen war. Die von ihm nach den Richtlinien zur Wäschedesinfektion ermittelten BPL-Konzentrationen lagen je nach Temperatur, 10 bzw. 20°C, bei denen die Versuche durchgeführt wurden, bei $0,5 \times 10^{-2}$ bzw. 10^{-3} (0,5 bzw. 0,1 Vol%), wobei die Ausgangslösung jedoch nur 30%ig war. Die Zeit zur Abtötung betrug 4 Stunden (12). Von Kiel desinfizierte engmaschigen Batist, der mit Keimsuspensionen von *E.coli* und *Ps.aeruginosa* durchtränkt war, mit 1%iger BPL-Lösung (Ausgangslösung 97%iges, gereinigtes BPL) in 10 Minuten sowie *M.aureus* var. *haemolyticus* SG 511 mit 2%iger Lösung in der gleichen Zeit. Einen scheinbar etwas stärkeren Desinfektionseffekt erzielte sie bei angetrockneten Kei-

men, was jedoch augenscheinlich auf eine Reduzierung der Keimzahl durch das Austrocknen zurückzuführen war. Durch einen Zusatz von geronnenem Blut zu den Lappchen wurde die bakterizide Wirkung nicht deutlich eingeschränkt (50).

Die experimentellen Erfahrungen, die bereits mit BPL an Bakterien, Pilzen und Bakteriensporen und Viren gemacht wurden, seine Wirksamkeit in organischem Material, wie in wässriger Lösung und als Aerosol werfen die Frage auf, wie diese keimtötende Wirkung zustande kommt, die in augenscheinlichem Gegensatz zum Aktionsmodus anderer Desinfizientien steht, die beispielsweise durch Schwermetalle, kationische Oberflächenaktivität oder Oxydation wirken. Ferner interessieren all jene Faktoren, die die Wirkung von BPL als Sterilisations- und Desinfektionsmittel beeinflussen.

3. Die Wirkungsweise von Beta-Propiolakton (BPL) und einflußnehmenden Faktoren bei der Sterilisation und Desinfektion

Bezüglich des Wirkungsmechanismus von BPL finden sich in der Literatur nur geringe Hinweise. Hoffman und Warshowsky sahen in dem weiten Wirkungsspektrum von BPL eine Ähnlichkeit mit Formaldehyd und Äthylenoxyd und glauben, daß es wie diese Mittel als alkylierende Substanz reagiert (36). Darauf läßt auch die chemische Reaktion des Laktons schließen, bei dem der Ring am ersten oder dritten C-Atom aufgespalten wird



und damit als freies Radikal schnell wieder neue Verbindungen einzugehen versucht. Daß diese Ringöffnung jedoch so rasch zustandekommt, liegt wiederum im besonderen Wesen des β -Propiolaktons, welches als viergliedriges Ringsystem unter besonderen innermolekularen Spannungen steht (s. Abschnitt II).

Für das Zustandekommen einer optimalen keimtötenden Wirkung sind nicht nur von zweitrangiger Bedeutung verschiedene andere Faktoren, von denen der Erfolg abhängt. Sie sind natürlich nicht nur spezifisch für BPL, sondern müssen auch bei anderen Desinfizientien beachtet werden. Trotzdem scheint eine kurze Schilderung dieser Faktoren angezeigt.

Die keimtötende Wirkung von BPL ist einmal abhängig vom Keimtiter, d.h. die benötigten BPL-Dosen lassen sich verringern, wenn die Keimzahl gesenkt

wird. Diese Tatsache wies LoGripo an MM-Viren in 100% ACD-Plasma nach, deren Konzentration in jeweils 10-fachen Verdünnungen zwischen 10^{-1} und 10^{-5} variierten. Konstant waren BPL-Konzentration (0,1%), Inkubationszeit (2 Stunden) und Temperatur (37°C). Der Grad der Inaktivierung wurde im Tierversuch bei Mäusen festgestellt, wobei einer 80%igen Mortalität eine 20%ige Virusinaktivierung entsprach. Die Verdünnung von 10^{-2} zeigte bei 0,1% BPL nur ca. 70% Inaktivierung, erst von 10^{-3} an waren keine Viren mehr nachweisbar. Bei 0,05% BPL-Lösung war keine viruzide (vollkommen abtötende) Wirkung vorhanden, doch war eine deutliche Reduzierung der Keimzahl feststellbar: bei 10^{-4} ca. 60% und bei einer Virusverdünnung von 10^{-5} ca. 80% Virusinaktivierung (26, 30, 63). Die Wirksamkeit eines Desinfektionsmittels steigt im allgemeinen mit der Temperatur. Dies gilt auch für BPL, doch ist bedeutsam, daß es im Gegensatz zu anderen Desinfizientien, z.B. Formalin, auch bei niedrigen Temperaturen eine keimtötende Wirkung erzielt, wenn die Einwirkzeit entsprechend verlängert wird. LoGripo konnte bei folgenden Temperaturen und Einwirkzeiten Viren in Plasma abtöten:

Tabelle 4

Die viruzide Wirkung von BPL in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit

Temperatur $^{\circ}\text{C}$:	4	6-10	24-27	37
Einwirkzeit Std.:	72	12-24	7-12	1-2

Bei 10°C wurden sowohl die tuberkulozide Wirkung bei der Wäschedesinfektion als auch die Abtötung von Sporen bei der Anwendung von BPL in der Dampfphase nachgewiesen (12, 39).

Je höher die Temperaturen bei der Desinfektion mit BPL gewählt werden, um so eher verliert jedoch auch die Substanz ihre keimtötende Wirkung. Das hängt mit dem schneller ablaufenden hydrolytischen Abbau von BPL zu nicht mehr keimtötend wirkenden Substanzen zusammen.

Husmann bestimmte die temperaturabhängige bakterizide Aktivitätsabnahme einer 1%igen wässrigen BPL-Lösung. Er machte sofort nach Ansetzen der Lösung von 4° und 21°C und nach weiteren Zeitabständen (60, 150 u. 300 Min.) Bakterizidieteste gegenüber Staph. aureus var. haemolyticus SG 511 mit 1,0; 0,9 etc. bis 0,1%igen BPL-Verdünnungen. Nach 1 Stunde Aufbewahrung der Testansätze bei 37°C wurde aus jedem Röhrchen eine Öse auf

Blutagarplatten überimpft und nach 24 Stunden Inkubation das Keimwachstum kontrolliert. Das Ergebnis war, daß bei 21°C die 1%ige BPL-Lösung nach 5 Stunden keinen bakteriziden Effekt mehr aufwies und auch die Lösung von 40°C einen, wenn auch wesentlich langsameren, Aktivitätsverlust zeigte (Abb.4).

Wenn auch der Aktivitätsverlust eine gewisse Parallelität zu der Hydrolyserate zeigt, so ist er doch damit nicht gleichzusetzen. Die Hydrolyserate, die durch Titrieren der Gesamtsäure gemessen werden kann, bleibt hinter der Inaktivierungsrate zurück. Vergleicht man z.B. die Virusinaktivierung und den hydrolytischen BPL-Abbau mit den Einwirkzeiten, so stellt man fest, daß eine viruzide Wirkung von 0, 1, 0,2 und 0,3%igen BPL-Lösungen bereits vor der Halbwertszeit der Substanz (28-32 Min. bei 37°C) eingetreten ist (Abb.5).

Während dieser Zeit ist die Substanz so eng mit den Keimen eingegangen, daß sie auch durch eine BPL-neutralisierende Substanz wie Natriumthiosulfat nicht mehr aufgehoben werden kann. Diese Eigenart konnte experimentell nachgewiesen werden und geht aus Abbildung 6 hervor. Zu bestimmten Zeiten (s. Pfeile) wurde BPL in Teilen des Plasma-Virus-BPL (0,2 %ig)-Gemisches durch gleiche molare Mengen von Natriumthiosulfat neutralisiert und die weitere viruzide Wirkung dieser Teilmengen nach 3 und 24 Stunden kontrolliert (punktierte Linie). Sie zeigten kein deutliches Ansteigen des Virustiters mehr, die Inaktivierung war also irreversibel. In diesem Versuch fiel besonders auf, daß bereits nach der Viertelwertzeit von BPL das Natriumthiosulfat bereits an Keime gebundenes BPL nicht mehr neutralisieren konnte und dieses zur Sterilisierung ausreichte.

Unterschiedliche Auffassung vertreten die Autoren in der Bedeutung des pH-Wertes für die Wirksamkeit von BPL. Nach Polley und Mitarbeitern steigt die viruzide Wirkung bei der Bereitung von Vaccinen mit der Erhöhung des pH auf optimal pH 8; bei pH 6 sei die Inaktivierung langsamer und unsicher (78). Lo Grippo hatte jedoch in den Bereichen von pH 9,2 bis 6,8 und pH 6,8 bis 4,9 bei der Abtötung von MM-Viren in ACD-Plasma gleich gute Ergebnisse und folgert, daß die viruzide Wirkung von BPL pH-unabhängig ist (63). Untersuchungen über den Einfluß von Fremdeiweiß auf die keimtötende Wirkung von BPL ergaben bei manchen Testen keine deutliche Einschränkung (12 u. 38). Eine exakte Untersuchung von Lo Grippo (63) zeigte jedoch, daß eine deutliche Abhängigkeit der viruziden BPL-Konzentration von dem unterschiedlichen Eiweißgehalt verschiedener Plasmaverdünnungen besteht (s. Abb.7).

Für die Wirksamkeit von BPL in der Dampfphase ist die Einregulierung der relativen Feuchtigkeit der Raumluft von entscheidender Wichtigkeit. Erst bei

geringste bakterizide BPL-Verdünnung in %

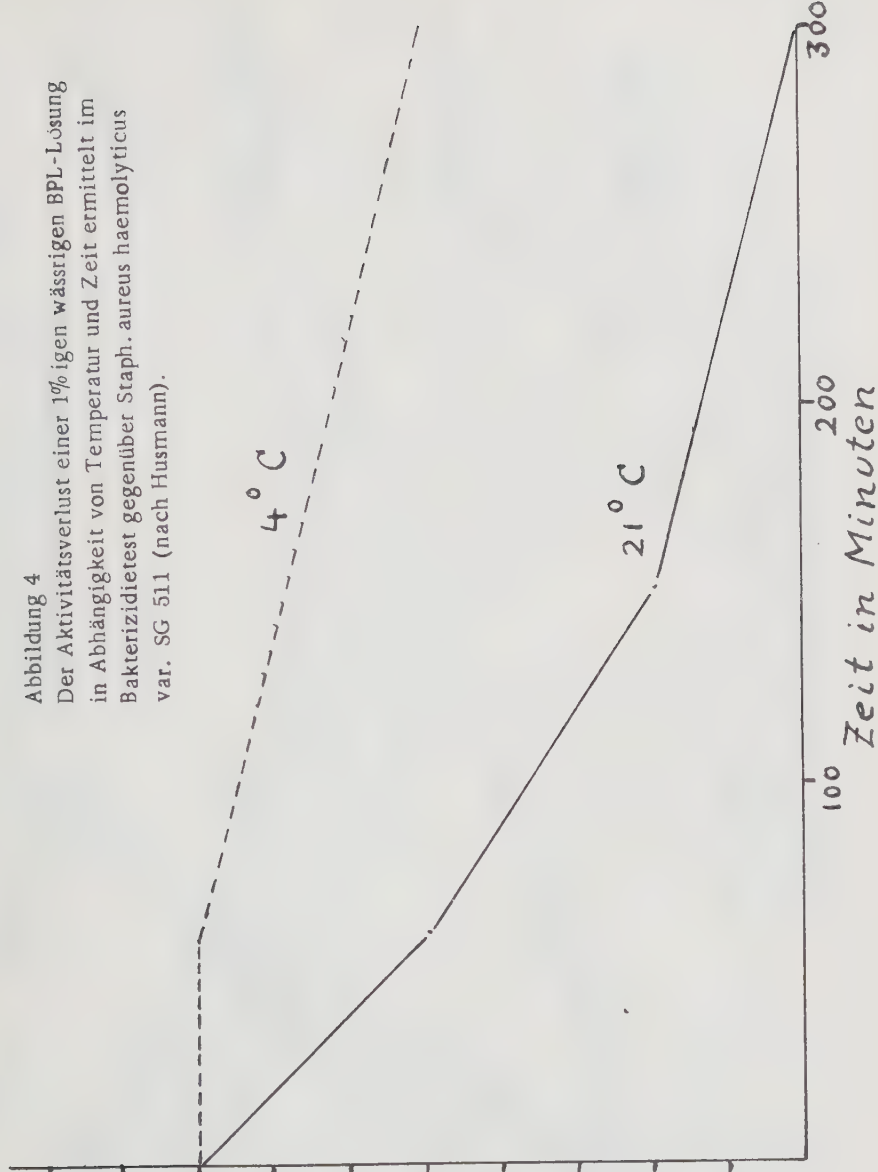


Abbildung 4

Der Aktivitätsverlust einer 1% igen wässrigen BPL-Lösung in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit ermittelt im Bakterizidietest gegenüber *Staph. aureus haemolyticus* var. SG 511 (nach Husmann).

Virus-Titer

10^{-8}
 10^{-7}
 10^{-6}
 10^{-5}
 10^{-4}
 10^{-3}
 10^{-2}
 10^{-1}
 0

Virus-Titer (1000 mg BPL/l)
 Virus-Titer (3000 mg BPL/l)
 Virus-Titer (2000 mg BPL/l)

ges. Säure (3000 mg BPL/l)
 ges. Säure (2000 mg BPL/l)
 ges. Säure (1000 mg BPL/l)

ml N/10
 Säure

Abbildung 5
 Inaktivierungsrate von MM-Viren und Hydrolyserate von BPL
 in menschlichem ACD-Plasma (Inkubation bei 37°C.)
 (nach LoGrippe)

15 30 45 60 90 120 180

Zeit in Min. (Basis 10)

3

1440

Log. d. Virus
Verdünnung

Irreversible Inaktivierung von MM-Viren, dargestellt durch
Neutralisation des BPL mit Natriumthiosulfat
(2000 mg BPL/l, 90%iges ACD-Plasma bei 25°C)
(nach LoGruppo)

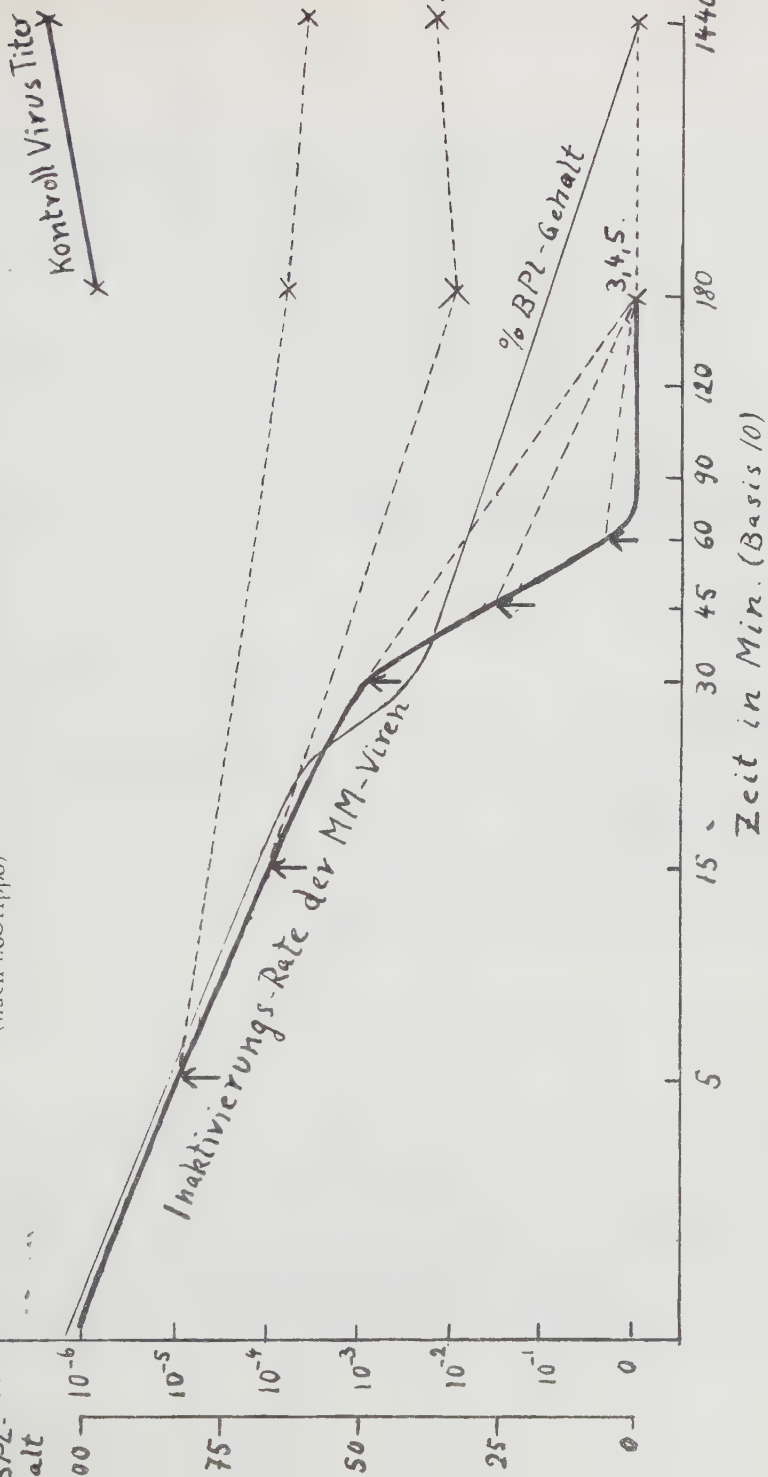
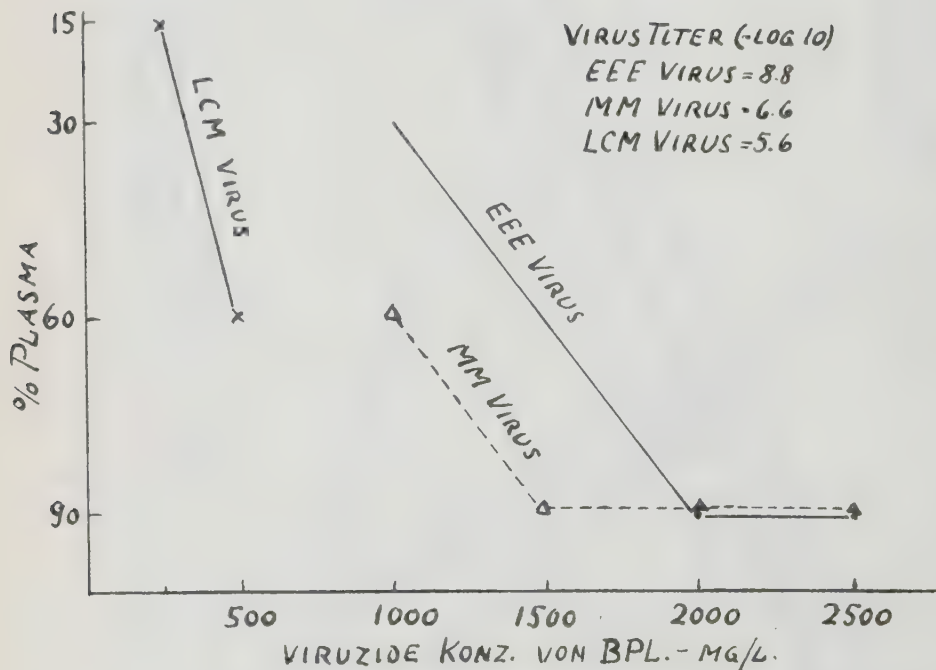


Abbildung 7

Der Effekt verschiedener Proteinkonzentrationen auf die viruzide Aktivität von BPL

(nach LoGrippe)



einer relativen Luftfeuchtigkeit von 75% kann mit einer schnellen Abtötung der Keime durch BPL gerechnet werden. Bei einem Feuchtigkeitsgehalt von 50% ist nur noch ein geringer keimtotender Effekt zu verzeichnen. Die Kurve der Absterberate steigt mit zunehmender relativer Luftfeuchtigkeit geradlinig und steil an, während sie bei niedrigem Prozentgehalt nur flach verläuft (36).

Bei der Behandlung der chemischen Eigenschaften von BPL war auf den schnellen hydrolytischen Abbau der Substanz hingewiesen worden, als dessen Endprodukte Acrylsäure und Hydracrylsäure, β -substituierte Propionsäuren und Polymere entstehen. Da BPL also je nach Temperatur und Einwirkzeit sehr bald nicht mehr in den Lösungen nachweisbar ist, war es denkbar, daß z.B. die Hydracrylsäure, die sich nur durch die β -Stellung der OH-Gruppe von der Milchsäure unterscheidet, und der man eine desinfizierende Wirkung zuschreibt, ebenfalls einen Einfluß auf das Keimwachstum entwickelt.

4. Die antimikrobiellen Eigenschaften der Abbauprodukte von Beta-Propiolakton (BPL)

waren daher auch Gegenstand weiterer Untersuchungen. Der Anfall von Hydracrylsäure beträgt im Plasma ca. 70 bis 80%; 2 bis 10% sind β -Chloropropionsäure. In physiologischer NaCl-Lösung ist der Anteil der β -Chloropropionsäure etwas höher: ca. 25%. Kurzkettige Polymere fallen bei den starken Verdünnungen nur in geringem Umfang an (s. Abb.1); auch Acrylsäure wird nur wenig gebildet (33,49). Versuche mit reiner Hydracrylsäure (= β -Hydroxypropionsäure), β -Chloropropionsäure und kurzkettigen Polymeren an Viren in 90%igem Plasma mit Konzentrationen von 0,4 bis 1% zeigten keinerlei Reduktion der Virusaktivität (60).

IV. TOXIZITÄT UND MATERIALSCHÄDEN

Von entscheidender Bedeutung für die Anwendbarkeit der Substanz als Sterilisations- und Desinfektionsmittel ist die Frage der akuten und chronischen Toxizität von BPL und seiner Abbauprodukte sowie korrodierende und sonstige schädigende Einflüsse auf Metalle, Kunststoffe und andere Materialien.

In reiner, konzentrierter Form wirkt BPL als Ätzgift. Es wirkt auf der Haut stark blasenbildend und verursacht brennende Schmerzen. Bei einer Laborantin unseres Labors, die etwas von der konzentrierten Lösung verschüttete, wurden Nylon-Strümpfe teilweise zerstört, da sie das Mittel aber bald mit Wasser

abspülte, trat nur noch eine mittlere erythembildung mit leichtem Brennen der Haut auf.

In 6 von uns durchgeführten Versuchen zur hygienischen Hände-Desinfektion, bei denen die Hände 2¹/₂ Minuten mit 1 und 2% igen BPL-Lösungen in Berührung waren, und dann mit Wasser abgespült wurden, zeigten sich keinerlei Hautreaktionen. Auch konzentrierte Lösungen, die sofort abgespült werden, sollen keine Spuren hinterlassen (10, 86).

Feazel und Lang machten Untersuchungen über den Hauteffekt von BPL-Dampf, der direkt auf den entblößten Unterarm wirkte, sowie von Kleidungsstoffen (Schafwolle, Baumwolle, Nylon, Leder und Gummi), die dem Dampf ausgesetzt und 6 Stunden mit einer Hautstelle unter dem Schulterblatt in Berührung waren.

Die einwirkenden Konzentrationen lagen zwischen 1,5 und 2 mg BPL/l Luft, also durchaus im Desinfektionsbereich. In fast jedem Test wurde eine schwache bis leichte Erythem- und gelegentlich auch leichte Blasenbildung beobachtet. Besonders der Kontakt mit den behandelten Leder- und Gummiprobe n hatte stärkere Auswirkungen auf die Haut. Eine besondere Neigung zur Adsorption von BPL zeigten verschwitzte Kleidungsstellen. Sie verursachten an der eng darunter liegenden Haut Blasenbildungen. Es wird daher empfohlen, während der Desinfektion von Räumen diese nicht zu betreten und im Bedarfsfall Schutzanzüge und Gasmasken zu tragen. Die geringste Menge, die eben noch durch den Geruch wahrnehmbar ist, beträgt 0,05 mg BPL/l Luft. Eine Konzentration von 0,1 mg/l Luft können Personen nicht länger als 5 Minuten ertragen. Sie wirkt stark tränenreizend (5, 10, 36, 86). Tierexperimentelle Untersuchungen ergaben, daß Ratten, die einer Durchschnittskonzentration von 0,36 mg BPL/l Luft 2 Stunden lang ausgesetzt waren, zu 40% starben. Bei der doppelten Konzentration starben in der gleichen Zeit 80% der Ratten (86). Die chronische i.v.-Zufuhr wässriger BPL-Lösungen zeigte eine deutliche Kumulation der Substanz und als deren Folge Gewichtsverlust sowie Nekrosen der Nierentubuli und des Leberparenchyms.

Im Tierversuch wurde die Hautverträglichkeit an Ratten und Mäusen von Roe und Mitarbeitern (82, 83), Searle (85) und Walpole und Mitarbeitern (93) getestet. 2,5 und 10% ige BPL-Lösungen wöchentlich einmal auf den Rücken dieser Tiere aufgetragen, verursachten nach 27 Wochen Papillome, nach 40 Wochen Kartzinome. Auch subkutan injizierte BPL-Verdünnungen verursachten maligne Tumoren. Selbst die Anwendung kaum hautreizender Dosen führte auf die Dauer zu Tumorbildung.

Da BPL jedoch normalerweise nur in vitro vorkommt und die Substanz bei der Sterilisation von Transplantaten sehr schnell abbaut, ist bei der Transplanta-

tion von Haut, Arterien, Knochen und Knorpel nie ein Fall von Tumorbildung bekannt geworden. Von den vielen Hundert Gewebeverpflanzungen heilten alle primär ein. Die histologische Untersuchung einmalig desinfizierter Hauttransplantate zeigte selbst nach 6 Wochen gegenüber unbehandeltem Gewebe keine Unterschiede. Die Osteoklasten- und Osteoblastenbildung verlief stets normal. Gefäße vom elastischen Typ waren jedoch zur Transplantation geeigneter, da die glatte Muskulatur in wenigen Wochen verschwand (71).

Für die klinische Anwendung von BPL zur Sterilisation von Plasma, Serum und Transplantaten stellt die reine Substanz nicht das eigentlich toxikologische Problem dar. Vielmehr sind es ja die schnell gebildeten Abbauprodukte wie Hydracrylsäure und β -Chloropropionsäure sowie deren Salze, die mit Transfusion und Transplantat auf den Menschen übertragen werden. Hydracrylsäure wird z.B. selbst vom menschlichen Organismus im Fettstoffwechsel gebildet und unterscheidet sich von der Milchsäure des Kohlenhydratstoffwechsels nur durch die Stellung der OH-Gruppe. Auch in ihrer Giftwirkung entspricht sie der Milchsäure. Die LD₅₀-Dosen für BPL und seine Abbauprodukte unterscheiden sich deutlich (Tabelle 5) (29, 30, 44-47, 49).

Tabelle 5

Vergleich der LD₅₀-Dosen in mg/kg Körpergewicht von i.v. zugeführtem BPL, seiner Abbauprodukte und Milchsäure

	BPL	Natrium- β - Chloropropionat	Natrium- Hydracrylat
Maus	345 $\pm$ 8,8	1900 $\pm$ 20	2400 $\pm$ 28
Kaninchen	51 $\pm$ 25	1700	2000
Meerschweinchen	150	1750	2000
Hund	90	1750	2000

LD₅₀ von Milchsäure i.v. bei Mäusen 2200 mg/kg.

Die akute Toxizität der Abbauprodukte ist bei verschiedenen Tieren abhängig vom Hydratationszustand; mit der Dehydratation steigt die Toxizität an. Dosen, die an der Grenze der Toxizität liegen, verursachen Veränderungen, die primär der hypertonen Lösung zuzurechnen sind. Sie beeinflussen die

Diurese und verursachen Elektrolytstörungen und EKG-Veränderungen. Bei Hunden und Kaninchen wurden zeitweilig Verminderung der Lympho- und Monozyten beobachtet mit kompensatorischem Anstieg der neutrophilen Zellen und einer leichten Erhöhung der Gesamt-Leukozytenzahl. Letale Dosen von β -Chloropropionsäure verursachten Auflösung der Keimzentren im Lymphknoten (49).

Bei chronischer Zufuhr von β -Chloropropionsäure und besonders Hydracrylsäure in Dosen, die allerdings beträchtlich höher lagen als sie üblicherweise mit Transfusionen auf Menschen und Tiere gelangten, wurde bei i.v.-Zufuhr eine leichte Kumulierung festgestellt, die sich besonders an Thrombozyten auswirkte. In der Reihenfolge spielte sich folgendes ab: Abfall der Gesamt-Thrombozytenzahl, stetige Abnahme neugebildeter Thrombozyten, schließlich massive Thrombozytolyse anaphylaktischer Art durch starke Histaminfreisetzung aus zerstörten Blutplättchen. Orale Gaben von 75% der oralen Toxizität verursachten keine Schäden (49). Dosen, wie sie durch wiederholte und größere Plasmatransfusionen in praxi auf Menschen und in äquivalenten Mengen auf Tiere aller Altersstufen übertragen wurden, zeigten keinerlei toxische Effekte, die auf eine der Substanzen zurückzuführen wären (30, 47, 49, 71). Bei genaueren Untersuchungen ergab sich, daß durch die gebräuchlichen BPL-Dosen und den daraus entstehenden Abbauprodukten Plasmaproteine nicht derart verändert werden, daß sie toxische oder Antigen-Eigenschaften bekommen, daß bei Berücksichtigung des pH-Wertes keine Hämolyse oder Steigerung der Erythrozytenlabilität herbeigeführt wird und eine befriedigende in vivo-Überlebenszeit und Funktion der Erythrozyten und Plasmaproteine gewährleistet ist (29). Auch wurden weder bei Menschen noch Tieren irgendwelche Veränderungen in EKG, Hämogramm, Körpergewicht, Leber- und Nierenfunktion festgestellt (47, 71).

Die Exkretion der Abbauprodukte geht schnell vonstatten und hat nach 12 Stunden mit ca. 70% der i.v. zugeführten Dosen ihren Höhepunkt erreicht (30). Ein Teil der β -Chloropropionsäure wird zu diesem Zweck in Hydracrylat umgewandelt (49). Weiterhin scheint eine beträchtliche Menge im Stoffwechsel aufzugehen. Dies geht aus der Inkubation der Abbauprodukte mit Mäuseleber hervor, die ein Verschwinden der Substanz zu 30% in 8 Stunden zur Folge hatte (49).

Exakte Untersuchungen über die Korrosionsfähigkeit von BPL wurden von Feazel und Lang an 14 verschiedenen Metallen bzw. Metalllegierungen unter extremen Bedingungen vorgenommen. Sie wurden Mischungen von BPL mit Wasser (80 : 20), BPL mit Tetrachlorkohlenstoff (50 : 50) sowie BPL mit Tetrachlorkohlenstoff und Wasser (45 : 45 : 45 bzw. 70 : 20 : 10) bei 21 und 55°C für 23 bzw. 16 Tage ausgesetzt. Die Korrosionsrate wurde in tausendstel

Durchdringung pro Jahr (Mils Penetration per Year = MPY) berechnet, wobei der Gewichtsverlust in mg mit dem spezifischen Gewicht der Metallprobe, der Oberflächengröße (in squ.in.) und der Expositionszeit in Stunden verglichen wurde. Unter der Voraussetzung, daß 30 MPY (0,03 inch) toleriert werden, zeigten 14 gebräuchliche Metalle bis auf Messing, Aluminium, Kupfer, galvanisierten Stahl und Gußeisen, deren Korrosionsrate an der Toleranzgrenze lag, keine erhebliche Erhöhung der Korrosionsrate. Es wird allerdings betont, daß die Bestimmung der Korrosionsrate keine ausreichende Aussage über die entstehenden Schäden und die weitere Verwendbarkeit von Gegenständen aus diesen Metallen macht. Einige Metalle, nämlich wie Kupfer, Messing, Nickel und Monel zeigten nach der Einwirkung von BPL einen grünen Überzug. Chrombestecke, galvanisierter Stahl und Gußeisen wiesen Rauigkeiten, Vertiefungen, Ätz- und Roststellen auf. Auch hatten sich teilweise Polymerisate als Filme niedergeschlagen. Diese Oberflächenveränderungen traten auch bei der Einwirkung von BPL-Dampf und dem aerosolähnlichen "Fallout" auf, obwohl die Korrosionsraten nur zwischen 0,5 und 0,7 MPY lagen. Besonders nachteilig waren die Veränderungen an Präzisionsgeräten.

Die Zerstörungen an Plastikstoffen waren unter den Versuchsbedingungen besonders stark. Handelsübliches BPL (96%ig) über 21 Tage bei 55°C angewandt, zerstörte fast alle geprüften 11 Stoffe, lediglich Polyäthylen zeigte nur geringe Spuren, während "Mylar" keinerlei Effekte aufzuweisen schien. Die anderen - Nylon, Plexiglas, Epoxy-, Melamin-Formaldehyd- und Phenol-Formaldehydstoffe sowie Polyäthylen, Polystylen, Polyurethan und Polyvinylchlorid - zeigten grobe Verformungen mit Blasenbildung, wurden gelartig oder zerbrachen. Etwas weniger schwerwiegend waren die Schäden durch den BPL "Fallout". In gesättigtem BPL-Dampf von 38°C waren nach 23 Tagen besonders Nylon und Polyvinylchlorid durch Auflösung bzw. Verfärbung und Brüchigkeit verändert (10). Wie gesagt, handelte es sich jedoch bei den geschilderten Testen um Versuche mit extremen Konzentrationen, Einwirkzeiten und z.T. auch Temperaturen, die in der Praxis bei Einhaltung der Vorschriften nie auftreten. Bei der Raumdesinfektion mit BPL-Dampf kann es allerdings leichter zu Schäden kommen, wenn die Aerosolgeräte nicht richtig arbeiten. So kam es gelegentlich zu stärkerem "Aerosol Fallout" oder gar zur Beregnung, was Beschädigung von Metallen und lackierten Flächen zur Folge hatte (4).

Fassen wir die Ergebnisse hinsichtlich Toxizität und Materialschädigungen zusammen, so müssen wir feststellen, daß die Substanz und ihre Abbauprodukte, Hydracrylsäure und β -Chloropropionsäure, bei der Sterilisation von

Transfusions- und Transplantationsmaterial in den dafür gebräuchlichen Dosen für Mensch und Tier unschädlich sind. Im Umgang mit der konzentrierten Lösung und bei der Anwendung von BPL in der Dampfphase sind einige Vorsichtsmaßnahmen zu beachten. Die Substanz muß wie jede starke Säure vor unbefugtem Zugriff gesichert sein. Verschütten auf die Haut, Kleidungsstücke und Gegenstände und eine längere Einwirkung daselbst muß vermieden werden oder, wenn dies geschehen ist, sofort mit reichlich Wasser abgespült werden. Auch die Exposition in BPL-Dampf muß Personen untersagt sein, da stets die Gefahr gefährlicher Hauteizungen und bei wiederholter Einwirkung auch der Tumorbildung gegeben ist. Im Bedarfsfall sind beim Betreten solcher Räume Schutzanzüge und Gasmasken zu tragen. Ferner ist stets auf einwandfreies Arbeiten der Aerosolgeräte zu achten.

V. DIE PRÜFUNG VON BETA-PROPIOLAKTON (BPL) IN WÄSSRIGER LÖSUNG ALS WÄSCHE- UND FLÄCHENDESINFEKTIONSMITTEL

Das weite Wirkungsspektrum und die Wirksamkeit von BPL in der Dampfphase sind eine wesentliche Voraussetzung für die keimtötende Wirkung der Substanz an porösen Gegenständen. Um diese beurteilen zu können, prüften wir den Wirkstoff, den wir von der Firma Th.Schuchardt als 97% iges, gereinigtes Präparat bezogen, an Wäschestoff und an der Fläche nach den "Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel" der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (53). In diesen Richtlinien wird zwischen einer Vorprüfung und einer Prüfung am Objekt unterschieden. Die Substanz wurde für die Dauer der Versuche in konzentrierter Form stets bei Kühlschranktemperatur gelagert und die jeweiligen Verdünnungen täglich frisch mit Aqua dest. angesetzt. Stets wurde darauf geachtet, daß die Verdünnungen schnell zur Anwendung kamen, um nicht den mit der sofort einsetzenden Hydrolyse einhergehenden Aktivitätsverlust der Lösung in Kauf nehmen zu müssen.

1. Die Vorprüfung von Beta-Propiolakton (BPL)

sollte Aufschluß über die wachstumshemmenden Eigenschaften, die keimtötende Wirkung und eine mögliche Neutralisation in der Subkultur (Enthemmung) geben.

a) Die wachstumshemmende Wirksamkeit von Beta-Propiolakton (BPL) untersuchten wir im Verdünnungstest. Ausgehend von einer Verdünnung 1:10 und 1:100 wurden in Röhrchen mit jeweils 5 ml einer 1,5%igen Lackmus-Saccharose-Lösung, der je ein Tropfen einer 1:10 verdünnten 16-stündigen Bouillonkultur zugesetzt war, steigende Verdünnungen angelegt. In jeder Versuchsreihe diente ein Röhrchen mit 5 ml Saccharoselösung, dem statt BPL Wasser zugeführt wurde, als Wachstumskontrolle.

Alle Versuche wurden im doppelten Ansatz durchgeführt und zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse mehrfach wiederholt. Die Auswertung erfolgte nach einer Inkubation von 24, 48 und 72 Stunden bei 37°C. Die Ergebnisse wurden an dem Farbumschlag der Lackmus-Saccharose-Lösung abgelesen und stets in der Subkultur gesichert.

Als Testkeime dienten *Staphylococcus aureus* haemolyticus var. SG 511, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Aspergillus niger*. Die Nährlösung für *Asperg. niger* bestand aus Traubenzuckerbouillon. Bei diesem Keim wurden die Ergebnisse nach 7- und 14-tägiger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur (21°C) ausgewertet.

Tabelle 6

Bakteriostatische Wirkung von Beta-Propiolakton in vitro
(Ausgangsverdünnung 1:10)

ß-Propio- lakton 1:	Staph. aureus haemol. SG 511	E.coli	Proteus vulgaris	Ps.aeru- ginosa	Asperg. niger	Kontrolle
20	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
40	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
80	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
160	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
320	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
640	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
1280	+	Ø	Ø	Ø	Ø	+
2560	+	+	+	+	Ø	+
5120	+	+	+	+	+	+

Zeichenerklärung: + = gutes Wachstum
(+) = schwaches Wachstum
Ø = Kultur negativ, kein Wachstum
Zahlen = Anzahl der noch gewachsenen Kolonien

Tabelle 7

Die bakteriostatische Wirkung von Beta-Propiolakton
(Ausgangsverdünnung 1: 100)

β-Propio- lakton 1:	Staph. aureus var. haemol. SG 511	E.coli	Proteus vulgaris	Ps.aeru- ginosa	Asperg. niger	Kontrolle
200	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
400	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
600	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
800	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
1000	+	Ø	Ø	Ø	Ø	+
1200	+	Ø	Ø	Ø	Ø	+
1600	+	Ø	Ø	Ø	Ø	+
3200	+	+	+	+	(+)	+
6400	+	+	+	+	+	+

Zeichenerklärung s. S.25

b) Die Neutralisation von Beta-Propiolakton (BPL) in der Subkultur
(Enthemmung)

Die Aufhebung der bakteriostatischen Wirkung durch den Zusatz unterschiedlicher Enthemmungsmittel prüften wir zunächst mit Hilfe des Agardiffusionstestes. Dabei gingen wir so vor, daß wir BPL in ein Agarloch in der Mitte einer Agar-
gußplatte des Testkeimes gaben. Die zu prüfenden Substanzen füllten wir in
Agarlöcher am Rande der gleichen Kulturplatte. Eine Aufhebung der bakterio-
statischen Wirkung von BPL mußte sich darin verdeutlichen, daß um das mit
dem Enthemmungsmittel beschickten Agarloch ein Wachstum des Testkeimes
erfolgte. Es wurden geprüft: Tween 1% ig, Cystein 1% ig, Thioglykolatbouil-
lon, Seife 1% ig, Serum 20% ig. Nach Bebrütung der Kulturen zeigte sich,
daß keine der geprüften Substanzen in der Lage war, die wachstumshemmen-
de Wirkung von BPL zu neutralisieren.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, führten wir weitere Versuche mit Hilfe des
Verdünnungstestes durch. Dabei wurde wie in der oben beschriebenen Form die
Verdünnungsreihe angelegt und BPL in einer Verdünnung 1: 100 im Enthem-
mungsmittel gelöst überpipettiert. Als Testkeim diente wieder Staphylococcus

aureus haemolyticus var. SG 511. Auch in diesem Versuch ergab sich in Übereinstimmung mit dem einfachen Reihenverdünnungstest ein bakteriostatischer Effekt gegenüber Staph. aureus bei einer Konzentration von 1: 800.

Tabelle 8

Verdünnungstest mit Enthemmungsmitteln

Testkeim: Staphylococcus aureus haemolyticus var. SG 511

ß-Propiolakton 1:	Tween 1% ig	Serum 20% ig	Seife 1% ig	Thioglykolat	Cystein 1% ig
200	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
400	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
800	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
1600	+	+	+	+	+
3200	+	+	+	+	+

1. Keimkontrolle +
2. Zeichenerklärung s. S.25

Überblicken wir unsere Enthemmungsversuche, so müssen wir feststellen, daß bei BPL eine Neutralisation der wachstumshemmenden Wirkung im Agardiffusionstest, sowie im Verdünnungstest durch die üblichen Enthemmungsmittel nicht möglich erscheint. Das Ergebnis war naheliegend, weil BPL sich zur Entkeimung von Blut und Autopsieproben eignen soll und hier ein starker Eiweißfehler dieser Wirkung entgegenstehen würde. Dennoch prüften wir in unseren weiteren Untersuchungen auch im Bakterizidietest, inwieweit ein Zusatz von Eiweiß in Form von 20%igem Serum die keimtötende Wirkung von BPL gegenüber Staph. aureus haemolyticus var. SG 511 reduziert. Zu diesem Zweck wurden 1- und 2%ige BPL-Lösungen in 20%igem Serum hergestellt und 0,1 ml der 1: 10 verdünnten Keimsuspension von einer 16-stündigen Kulturbouillon zugefügt. Die bakterizide Wirkung wurde durch Ausstriche auf Blutagarplatten nach 2¹/₂, 5, 10 und 15 Minuten und nach einer Bebrütungszeit im Inkubator bis zu 72 Stunden bestimmt.

Tabelle 9

Die bakterizide Wirkung von Beta-Propiolakton im Suspensionsversuch zur Bestimmung des Eiweißfehlers in 20% igem Serum

Testkeim	Konzentration von β -Propio- laktone in %	Inkubation Std.	Einwirkzeit in Minuten			
			2 1/2	5	10	15
Staph. aureus haemolyticus SG 511	1%	24	+	8	Ø	Ø
		48	+	8	Ø	Ø
		72	+	(+)	Ø	Ø
	2%	24	+	Ø	Ø	Ø
		48	+	Ø	Ø	Ø
		72	+	Ø	Ø	Ø

Zeichenerklärung s. S. 25

Der Versuch ließ keinerlei Einflußnahme des Serums auf die bakterizide Wirkung von BPL erkennen. Ein in ähnlicher Anordnung ausgeführter Versuch in 30% igem Vollblut bestätigte ebenfalls, daß die Wirksamkeit von BPL durch Zusatz eiweißreicher Medien nicht eingeschränkt wird. Es wurden in diesem Versuch neben Staphylococcus aureus auch Escherichia coli, Proteus vulgaris und Pseudomonas aeruginosa getestet (Tabelle 10), sowie zwei verschiedene Züchtungen von Staph. aureus - aus Mainz und Jena -, die sich in ihrer Resistenz gegenüber anderen Desinfektionsmitteln etwas unterschieden (Tabelle 11).

Tabelle 10

Die bakterizide Wirkung von Beta-Propiolakton in Vollblut (30% ig) zum Nachweis des Eiweißfehlers

	1% ige BPL- Lösung				2% ige BPL- Lösung				Kontrolle
Staph. aureus haem. SG 511	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
E. coli	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
Proteus vung.	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
Ps. aeruginosa	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
	5' 15' 30' 60'				5' 15' 30' 60'				

Zeichenerklärung s. S. 25.

Tabelle 11

Die bakterizide Wirkung von Beta-Propiolakton an zwei verschiedenen Züchtungen von *Staph. aureus haemolyticus* SG 511 (aus Mainz und Jena) im Vollblut (30% ig)

Testkeim	Konzentration	Zeit in Minuten			
		5'	15'	30'	60'
Staph. aureus	0,1 %	+	+	+	+
haemolyt.	0,25%	+	+	+	20
SG 511	0,5 %	+	+	2	Ø
Mainz	1,0 %	+	Ø	Ø	Ø
Staph. aureus	0,1 %	+	+	+	+
harmolyt.	0,25%	+	+	+	(+)
SG 511	0,5 %	+	+	23	Ø
Jena	1,0 %	+	Ø	Ø	Ø

Zeichenerklärung s. S.25

c) Die keimtötende Wirkung von Beta-Propiolakton (BPL)

Die Bestimmung der bakteriziden und fungiziden Wirkung wurde in der Suspensionsmethode durchgeführt. Zur Untersuchung dienten folgende Testkeime: *Staphylococcus aureus haemolyticus* SG 511, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Trichophyton pedis* (Kaufmann-Wolf). Die Bakterien und Pilzsuspensionen wurden mit einer 16-stündigen Schrägagar-kultur durch Abschwemmung mit 5 ml steriler Nährbouillon bzw. NaCl-Lösung (bei Pilzen) gewonnen und mittels Glasperlen durch kräftiges Schütteln in eine homogene Keimsuspension überführt. Zu 9,9 ml der Desinfektionsmittelverdünnung wurde 0,1 ml Keimsuspension gegeben und das Reaktionsgemisch für die vorgesehenen Einwirkzeiten bei Zimmertemperatur belassen. Danach wurde jeweils eine Öse der Mischung auf einen Sektor einer Blutagarplatte bzw. bei *E.coli* auf eine MacConcey-Platte geimpft. Die Pilze wurden auf Czapek-Dox-Medium übertragen. Die Ergebnisse wurden nach 24- und 48-stündiger Bebrütung im Inkubator bei 37°C abgelesen, während das Pilzwachstum nach 7, 14, 21 und 28 Tagen bei Zimmertemperatur kontrolliert wurde.

Tabelle 12

Die keimtötende Wirkung von Beta-Propiolakton (BPL)

Testkeim	Einwirkzeit Min.	BPL-Konzentration in %			
		0,1	0,25	0,5	1,0
Staph. aureus	5	+	+	+	+
	15	+	+	+	Ø
	30	+	+	Ø	Ø
	60	+	Ø	Ø	Ø
Ps. aeru- ginosa	5	+	+	+	Ø
	15	+	+	Ø	Ø
	30	+	(+)	Ø	Ø
	60	(+)	Ø	Ø	Ø
E. coli	5	+	+	+	(+)
	15	+	+	+	Ø
	30	+	(+)	Ø	Ø
	60	+	Ø	Ø	Ø
Proteus vulgaris	5	+	+	+	Ø
	15	+	+	Ø	Ø
	30	+	Ø	Ø	Ø
	60	Ø	Ø	Ø	Ø
Trichophyton pedis (Kaufmann- Wolf)	5	+	Ø	Ø	Ø
	15	Ø	Ø	Ø	Ø
	30	Ø	Ø	Ø	Ø
	60	Ø	Ø	Ø	Ø

Aus der Tabelle geht hervor, daß *Ps. aeruginosa* und *Proteus vulgaris* bereits nach 5 Minuten Einwirkzeit mit einer 1%igen BPL-Lösung abgetötet waren. Für *Staph. aureus* und *E. coli* waren bei gleicher Konzentration 15 Minuten zur Abtötung nötig. Jedoch war auch bei geringeren Konzentrationen mit entsprechend verlängerten Einwirkzeiten eine Abtötung von *Staph. aureus* und den anderen genannten Keimen möglich; alle Keime waren nach 30 Minuten mit der 0,5%igen Lösung abgetötet, und auch die 0,25%ige Lösung vermochte bei doppelter Einwirkzeit den gleichen Effekt zu erzielen.

Die sporozide Wirkung von BPL im Suspensionsversuch wurde an Sporen von *Bacillus subtilis* und *Bacillus mesentericus* untersucht. Die Sporensuspensionen wurden durch Abschwemmung gut versporteter Schrägagarkulturen mit jeweils 5 ml physiologischer Kochsalzlosung gewonnen und 60 Minuten im Wasserbad auf 60°C erhitzt. Außerdem ließen wir BPL auf Erdproben einwirken, in denen, wie die Kontrollversuche ergaben, sich lebhaft entwickelnde Sporen von Erdbazillen befanden. Sie wurden mit einer Spatelspitze feinkrümeliger, lufttrockener Erde den verschiedenen BPL-Verdünnungen zugesetzt. Die Ergebnisse wurden bei *Bac. subtilis* und *Bac. mesentericus* durch Entnahme einer Öse aus dem Reaktionsgemisch und Beimpfung auf Agarplatten nach 24 und 48 Stunden bzw. nach 14 Tagen Bebrütungszeit abgelesen.

Von dem Gemisch mit Erdsporen in den Erdproben wurde jeweils 0,1 ml mit der Pipette auf Nährbouillonröhrchen übertragen. Die Versuche wurden sowohl in wässriger Lösung als auch in Serum (20%ig) und Vollblut (30%ig) durchgeführt. Bei 1%igen Lösungen lagen die Zeiten zur Abtötung der genannten Sporen bzw. zur Sterilisierung von Erde zwischen 30 und 60 Minuten. Bei 0,5%igen BPL-Lösungen verdoppelte sich die Einwirkzeit bis zur sporoziden Wirkung auf 2 Stunden.

Tabelle 13

Abtötung von Subtilis-Sporen in wässriger Lösung und in Lösung mit 20% Serum bzw. 30% Vollblut

Sporen	Einwirkzeit Min.	BPL-Konzentration in %				
		0,25	0,5	0,75	1,0	2,0
in Wasser	30	+	+	+	(+)	Ø
	60	+	+	Ø	Ø	Ø
	120	+	Ø	Ø	Ø	Ø
	240	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø
in 20% Serum	30	+	+	+	Ø	Ø
	60	+	+	Ø	Ø	Ø
	120	+	Ø	Ø	Ø	Ø
	240	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø
in 30% Blut	30	+	+	+	+	Ø
	60	+	+	+	Ø	Ø
	120	+	+	Ø	Ø	Ø
	240	+	Ø	Ø	Ø	Ø

Fortsetzung Tabelle 13 Abtötung von *Bac. mesentericus*-Sporen

in Wasser	30	+	+	(+)	(+)	Ø
	60	+	(+)	Ø	Ø	Ø
	120	+	(+)	Ø	Ø	Ø
	240	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø
in 20% Serum	30	+	+	(+)	(+)	Ø
	60	+	(+)	Ø	Ø	Ø
	120	+	Ø	Ø	Ø	Ø
	240	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø
in 30% Blut	30	+	+	+	(+)	Ø
	60	+	+	(+)	Ø	Ø
	120	+	Ø	Ø	Ø	Ø
	240	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Wachstumskontrollen von *Bac. subtilis* und *mesentericus*-Sporen +.

Tabelle 14

Die Sterilisation von Sporenerde in wässriger Lösung und Serum (20% ig)

Einwirkzeit		BPL-Konzentration in %			
	Min.	0,25	0,5	0,75	1,0
Wasser	30	+	+	+	+
	60	+	+	+	Ø
	120	+	+	(+)	Ø
	240	+	Ø	Ø	Ø
20% Serum	30	+	+	+	+
	60	+	+	(+)	Ø
	120	+	+	Ø	Ø
	240	+	Ø	Ø	Ø

Wachstumskontrolle +.

Zusammenfassung der Vorprüfung von BPL

Überblicken wir die Ergebnisse der Vorprüfung von BPL, so können wir seine Wirkung wie folgt kennzeichnen:

1. BPL wirkt in einem weiten Spektrum wachstumshemmend und keimtötend auf grampositive und gramnegative Bakterien, auf Pilze und Sporen.
2. Die keimtötende Wirkung ist konzentrationsabhängig. 1% ige Lösungen töten Bakterien und Pilze bereits nach 5 bis 15 Minuten und Sporen nach 1 Stunde.
3. Die angewandten BPL-Konzentrationen verhalten sich umgekehrt proportional zur notwendigen Einwirkzeit, um eine keimtötende Wirkung zu entfalten; d.h. Verminderung der wirksamen Konzentration um die Hälfte, erfordert eine Erhöhung der Einwirkzeit um das Doppelte.
4. BPL ist auch bei Zimmertemperatur (20°C) schnell wirksam.
5. BPL ist durch die üblichen Enthemmungsmittel nicht neutralisierbar. Ein deutlicher Eiweißfehler ist bei Zufuhr von 20% igem Serum oder 30% igem Vollblut nicht festzustellen.

2. Die desinfizierende Wirkung von Beta-Propiolakton (BPL) am Objekt

Die Wäsche- und Flächendesinfektion sollte feststellen, ob BPL auch unter den Bedingungen der Praxis wirksam ist. Zu diesem Zweck ließen wir BPL auf künstlich infizierte Lappchen von Halbleinen und Wollflanell, verschiedenen rauhe Linoleumflächen, rauhe Glasperlen und Holzteile einwirken. Als Testkeime wurden die in der Vorprüfung untersuchten Bakterien, Pilze und Sporen verwendet. Diese Untersuchungen wurden alle bei Zimmertemperatur ausgeführt und ebenfalls die "Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel" (53) zur Grundlage der Versuche genommen.

a) Die keimtötende Wirkung von BPL an Halbleinen und Wollflanell als Keimunterlage

wurde an etwa 1 cm² großen sterilen Lappchen getestet, die mit je zwei Tropfen einer 16-stündigen Keimbouillon 15 Minuten gut durchtränkt wurden. Dann wurden die Keimträger in Reagenzglaschen mit verschiedenen wässrigen BPL-Verdünnungen gegeben und nach entsprechenden Einwirkzeiten sowie nach Abspülen mit sterilem Leitungswasser in 10 ml Nährbouillon übertragen.

Die Bebrütung der Röhrcchen ging bis zu 10 Tagen bei 37°C. Die Ergebnisse wurden täglich an der Trübung des Röhrccheninhaltes und im Zweifelsfall durch Subkulturen auf Agarplatten gesichert.

Tabelle 15

Die keimtötende Wirkung von BPL im Keimträgerversuch an Halbleinen

Testkeim	Einwirkzeit Min.	BPL-Konzentrationen in ‰				
		0,1	0,25	0,5	1,0	2,0
Staph. aureus haemol. var. SG 511	5	+	+	+	+	Ø
	15	+	+	+	+	Ø
	30	+	+	+	(+)	Ø
	60	+	+	Ø	Ø	Ø
	90	+	Ø	Ø	Ø	Ø
	120	+	Ø	Ø	Ø	Ø
Pseudomonas aeruginosa	5	+	+	+	Ø	Ø
	15	+	+	+	Ø	Ø
	30	+	+	Ø	Ø	Ø
	60	+	(+)	Ø	Ø	Ø
	90	+	Ø	Ø	Ø	Ø
	120	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø
Proteus vulgaris	5	+	+	+	Ø	Ø
	15	+	+	Ø	Ø	Ø
	30	+	+	Ø	Ø	Ø
	60	+	Ø	Ø	Ø	Ø
	90	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø
	120	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø

Wachstumskontrolle +

Tabelle 16

Die keimtötende Wirkung von BPL an Wollflanell

Testkeim	Einwirkzeit Min.	BPL.-Konzentrationen in %				
		0,1	0,25	0,5	1,0	2,0
Staph. aureus haemol. var. SG 511	5	+	+	+	+	Ø
	15	+	+	+	+	Ø
	30	+	+	+	+	Ø
	60	+	+	(+)	Ø	Ø
	90	+	Ø	Ø	Ø	Ø
	120	+	Ø	Ø	Ø	Ø
Pseudomonas aeruginosa	5	+	+	+	(+)	Ø
	15	+	+	+	Ø	Ø
	30	+	+	Ø	Ø	Ø
	60	+	+	Ø	Ø	Ø
	90	+	Ø	Ø	Ø	Ø
	120	+	Ø	Ø	Ø	Ø
Proteus vulgaris	5	+	+	+	(+)	Ø
	15	+	+	(+)	Ø	Ø
	30	+	+	Ø	Ø	Ø
	60	+	(+)	Ø	Ø	Ø
	90	+	Ø	Ø	Ø	Ø
	120	+	Ø	Ø	Ø	Ø

Wachstumskontrolle +

Im Keimträgertest zeigte sich, wie aus der Tabelle hervorgeht, eine teilweise Verzögerung der keimtötenden Wirkung gegenüber den Suspensionsversuchen der Vorprüfung. Während die Ergebnisse für *Proteus vulgaris* und *Pseudomonas aeruginosa* denen der Suspensionsversuche gleichkamen, in denen 1%ige BPL-Lösungen nach 15 Minuten die Läppchen desinfiziert hatten, konnte unter gleichen Bedingungen *Staph. aureus haemolyticus* var. SG 511 erst nach 30-60 Minuten abgetötet werden.

b) Die Desinfektion von Linoleumflächen

Weiterhin prüften wir die bakterizide Wirkung von BPL an Linoleumflächen, um eine eventuelle Brauchbarkeit des BPL als Scheuerdesinfektionsmittel nachzuweisen.

Als Keimunterlagen verwandten wir ältere, schon mehrmals gescheuerte, 6 cm² große Linoleumplatten, die je nach Farbe (grau, Braun, dunkelbraun und grün) auch eine zunehmende Rauigkeit aufwiesen; die grünen Platten waren leicht poros, die grauen wachsartig glatt. Zur Infektion der Flächen wurden Keimsuspensionen von *Staphylococcus aureus haemolyticus* SG 511 und *Escherichia coli* verwandt, die durch Abschwemmung einer 16-stündigen Kultur mit 10 ml Bouillon hergestellt wurden. Auf jede Linoleumplatte wurden 4 Tropfen der Keimsuspension pipettiert und mit einem Glasspatel gleichmäßig verteilt und antrocknen gelassen. Sodann wurden die infizierten Flächen mit einem Watteträger abgerieben, der zuvor in die entsprechende Desinfektionsmittelverdünnung eingetaucht worden war. Eine Serie der Platten blieb unbehandelt zur Kontrolle. Nach $\frac{1}{2}$ -, 1-, 2-, 4- und 6-stündiger Einwirkzeit des Desinfektionsmittels in Konzentration von 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 und 2,0% wurde zur Entnahme der Keime jeweils $\frac{1}{4}$ der behandelten Linoleumflächen mit einem Wattestäbchen, das vorher leicht mit Bouillon angefeuchtet worden war, gründlich abgerieben und mit leichtem Druck auf einen Sektor einer Blutagar- bzw. MacConcey-Platte ausgestrichen. In gleicher Weise wurden Keimentnahmen von den Kontrollplatten gemacht. Die so beimpften Platten wurden bei 37°C inkubiert und die zur Entwicklung gekommenen Keime nach 24-, 48- und 72-stündiger Bebrütung registriert.

Tabelle 17

Die bakterizide Wirkung von BPL gegenüber *Staphylococcus aureus* haemolyticus var. SG 511 an der Fläche (künstlich infizierte Linoleumflächen)

Testkeim	Linoleum- platten versch. Farbe u. Rauhigkeit	Einwirkzeit in Min.	BPL-Konzentration in %					
			0,1	0,25	0,5	1,0	2,0	5,0
Staph. aureus haemol. var. SG 511	grau	30	+	+	+	Ø	Ø	Ø
	dk.braun	30	+	+	+	Ø	Ø	Ø
	braun	30	+	+	+	(+)	Ø	Ø
	grün	30	+	+	+	+	Ø	Ø
	grau	60	+	+	+	Ø	Ø	Ø
	dk.braun	60	+	+	+	7	Ø	Ø
	braun	60	+	+	+	2	Ø	Ø
	grün	60	+	+	+	21	Ø	Ø
	grau	120	+	+	2	Ø	Ø	Ø
	dk.braun	120	+	+	(+)	Ø	Ø	Ø
	braun	120	+	+	20	Ø	Ø	Ø
	grün	120	+	+	(+)	Ø	Ø	Ø
	grau	240	+	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø
	dk.braun	240	+	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø
	braun	240	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	grün	240	+	+	6	Ø	Ø	Ø
	grau	360	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	dk.braun	360	8	8	Ø	Ø	Ø	Ø
	braun	360	4	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	grün	360	(+)	3	Ø	Ø	Ø	Ø

Wachstumskontrollen +

Tabelle 18

Die bakterizide Wirkung von BPL gegenüber *Escherichia coli* auf infizierten Linoleumplatten

Testkeim	Linoleum- platten versch. Rauhigkeit	Einwirkzeit in Min.	BPL-Konzentration in %				
			0,1	0,25	0,5	1,0	2,0
<i>Escheri- chia coli</i>	grau	30	+	+	Ø	Ø	Ø
	dk. braun	30	+	(+)	Ø	Ø	Ø
	braun	30	+	+	Ø	Ø	Ø
	grün	30	+	+	1	Ø	Ø
	grau	60	+	Ø	Ø	Ø	Ø
	dk. braun	60	+	Ø	Ø	Ø	Ø
	braun	60	+	Ø	Ø	Ø	Ø
	grün	60	+	1	Ø	Ø	Ø
	grau	120	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	dk. braun	120	3	Ø	Ø	Ø	Ø
	braun	120	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	grün	120	4	Ø	Ø	Ø	Ø
	grau	240	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	dk. braun	240	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	braun	240	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	grün	240	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Wachstumskontrollen nach 1 Stunde +
nach 6 Stunden (+)

Aus den mehrfach wiederholten Versuchen ging hervor, daß *Staph. aureus* haemolyticus SG 511 nach 1 Stunde von einer 1%igen BPL-Lösung abgetötet wurde bzw. nur eine geringe Anzahl von Kolonien gewachsen waren; *E. coli*-Keime waren bei gleicher Einwirkzeit schon bei 0,25 bis 0,5%igen BPL-Lösungen abgetötet. Auch nach 30 Minuten Einwirkzeit trat schon bei den untersuchten BPL-Konzentrationen eine desinfizierende Wirkung ein. So wurden in dieser Zeit Staphylokokken mit 2%iger BPL-Lösung abgetötet, *E. coli*-Kei-

me kamen bei 0,5%iger Lösung schon nicht mehr zur Entwicklung. Die Kontrollen waren durchweg gut bewachsen, lediglich bei E.coli war gelegentlich nur ein mäßiges Wachstum der Keimkontrollen nach 6 Stunden.

c) Die fungizide Wirkung von Beta-Propiolakton (BPL) an infizierten Holzstäbchen

Ist ebenfalls ein wichtiges Kriterium für die Prüfung von Scheuerdesinfektionsmitteln zur Verhütung von Hautpilzkrankungen. Die Methodik bestand darin, daß zunächst runde Holzstäbchen von 2 mm Dicke und 1,5 cm Länge im Autoklaven sterilisiert wurden. Sodann wurden sie 5 Minuten in eine Keimsuspension von *Aspergillus niger* bzw. *Trichophyton pedis* (Kaufmann-Wolf) eingelegt. Die derart infizierten Hölzchen wurden 1 Stunde bei 37°C auf sterilem Fließpapier getrocknet. Danach wurden die infizierten Keimträger in Schälchen mit 10 ml der zu prüfenden BPL-Verdünnung übergossen. Nach den vorgesehenen Einwirkzeiten wurden jeweils 2 Hölzchen entnommen; das eine sofort auf einen Czapek Dox-Medium Schrägagar übertragen, das andere vor der Verimpfung mit einer 0,5%igen Kalischmierseifenlösung kräftig gespült. Die Ergebnisse wurden in 7-tägigen Abständen bis zu 4 Wochen Bebrütungszeit bei Zimmertemperaturen abgelesen. Die bereits nach 14 Tagen registrierten Ergebnisse hatten sich in den darauffolgenden 2 Wochen nicht mehr verändert. Alle Kontrollen waren sehr gut gewachsen.

Tabelle 19

Die fungizide Wirkung von BPL im Keimträgertest an Holzstäbchen

Testkeim	Einwirkzeit Min.	BPL-Konzentration in %									
		0,1		0,25		0,5		1,0		2,0	
Aspergillus niger	*) 15	+	+	Ø	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	30	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	45	+	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	60	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
Tricho- phyton pedis (Kauf- mann-Wolf)	15	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	30	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	45	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	60	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

*) In der ersten Kolonne ist das Wachstum der Keime angegeben, deren Keimträger nicht mehr abgespült wurden, in der zweiten Kolonne stehen die Werte von Stäbchen, die zuvor mit 0,5%iger Kali-Schmierseifenlösung abgespült wurden. Zeichenerklärung s. S.25.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, zeigten die untersuchten Pilze eine besonders hohe Empfindlichkeit gegenüber BPL wie in den Voruntersuchungen. *Aspergillus niger* war bereits nach 15 Minuten Einwirkzeit bei 0,25% iger BPL-Lösung nicht mehr gewachsen. *Trichophyton pedis* kam in der gleichen Zeit schon bei 0,1% iger Lösung nicht mehr zur Entwicklung.

d) Die Abtötung von Sporen an rauen Glasperlen als Keimunterlage ist ein guter Anhaltspunkt für die Leistungsfähigkeit eines Desinfektionsmittels. Die Methodik bestand darin, daß die Glasperlen zunächst einer Vorbehandlung unterzogen wurden, indem sie mit verdünnter Salzsäure im Erlenmeyerkolben gekocht und nach dem Abkühlen durch mehrmaliges gründliches Abspülen mit Leitungswasser säurefrei gemacht wurden. Nach nochmaligem Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Glasperlen auf Filterpapier zum Trocknen ausgebreitet und anschließend in einer Pulverflasche im Heißluftsterilisator keimfrei gemacht. Danach wurden sie mit einer Erds孢ensuspension übergossen und längere Zeit kräftig durchgeschüttelt. Anschließend wurden die infizierten Perlen unter sterilen Bedingungen im Exsikkator bei Kühlschranktemperatur über Chlorcalcium getrocknet, sodann in die zu prüfenden Desinfektionsmittelverdünnungen gelegt und nach den vorgesehenen Einwirkzeiten mit sterilem Leitungswasser abgespült und in jeweils 10 ml Nährbouillon übertragen. Die Ergebnisse wurden nach 24 und 48 Stunden bzw. 14 Tagen Inkubation an der Trübung der Röhrchen abgelesen und durch Ausstriche auf feste Nährböden überprüft.

Tabelle 20

Abtötung von Erds孢en an kleinen Glasperlen als Keimunterlage

Zeit	0,25%	0,5%	1%	2%	3%	Kontrollen
15'	+	+	+	+	+	+
30'	+	+	+	Ø	Ø	+
45'	+	+	Ø	Ø	Ø	+
60'	+	+	Ø	Ø	Ø	+
90'	+	+	Ø	Ø	Ø	+
120'	+	Ø	Ø	Ø	Ø	+
180'	+	Ø	Ø	Ø	Ø	+
240'	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
300'	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+

Zeichenerklärung s. S.25

In diesen Versuchen vermochte eine 1% ige BPL-Lösung schon nach 45 Minuten die Erdsproren abzutöten. Selbst eine Konzentration von 0,25% war nach 4 Stunden Einwirkzeit sporozid wirksam. Die Wachstumskontrollen, die nach den jeweiligen Einwirkzeiten gemacht wurden, waren alle positiv.

VI. DISKUSSION DER GEWONNENEN ERGEBNISSE

Überblicken wir unsere experimentellen Ergebnisse hinsichtlich der keimtötenden Wirksamkeit von wässrigen BPL-Lösungen, so zeigt sich eine generelle Übereinstimmung mit den Eigenschaften, die in der Literatur angegeben werden. BPL entfaltet in vitro eine bakterizide Wirkung in Konzentrationen von 0,1 bis 1,0% und darüber, wobei die Einwirkzeiten zwischen 5 und 120 Minuten liegen. Die geringsten keimtötenden Konzentrationen variieren je nach Erreger. Grampositive Bakterien (Staphylokokken, Streptokokken, Enterokokken) waren deutlich resistenter als gramnegative (Salmonellen, Shigellen, Coli, Proteus, Pseudomonas). Staph. aureus benötigt bei gleicher Konzentration die doppelte Einwirkzeit und z. T. mehr als gramnegative Bakterien zur Abtötung. Lediglich E. coli und Ps. aeruginosa zeigten manchmal eine unterschiedliche Resistenz gegenüber BPL, als deren Ursache Lo Grippo die Bildung von Mikrozysten oder eine Änderung der enzymatischen Aktivität annimmt, die sich auf Grund anaerober Wachstumsbedingungen ergeben konnte (61, 81). Bei einer BPL-Konzentration von 0,2% benötigten wir in Übereinstimmung mit Huddleson und Husmann zur Abtötung von Staph. aureus 60 Minuten, zur Abtötung von Proteus vulgaris, Ps. aeruginosa und E. coli 30 Minuten (37, 38, 91).

0,1% ige BPL-Lösungen erforderten doppelte Einwirkzeiten, 120 bzw. 60 Minuten. Eine auffallende Empfindlichkeit wiesen Fungi gegenüber der Substanz auf, so daß wir zunächst einen Versuchsfehler vermuteten, der jedoch ausgeschlossen werden konnte. Außerdem fanden wir eine Bestätigung unserer Ergebnisse in der Literatur (37, 40, 50). Trichophyton pedis Kaufmann-Wolf war nach 5 - 15 Minuten mit 0,1% BPL abgetötet, desgleichen Trichophyton mentagrophytes Blank (Stamm 5) und Jo (Stamm 6) (50). In Versuchen mit BPL als Aerosol waren ebenfalls Pilze (Candida albicans, Penicillium, Aspergillus niger) nach 5 Minuten mit der geringen Konzentration von 0,5 mg BPL/l Luft abgetötet (40). Besonders hervorzuheben ist auch die sporozide Wirksamkeit von BPL bei noch relativ niedrigen Konzentrationen.

0,5% ige Lösungen vermochten Sporen von Bac. subtilis und mesentericus so-

wie Bac. Globigii (91) in 2 Stunden und 0,75%ige Lösungen in 1 Stunde abzutöten. Ein Zusatz von Fremdeiweiß in Form von 20%igem Serum oder 30% Vollblut brachte im Vergleich zu den Suspensionsversuchen mit wässrigen Lösungen bei niedrigen BPL-Konzentrationen geringfügige Abweichungen der Ergebnisse mit sich.

Unsere Untersuchungen dienten jedoch nur der Feststellung eines groberen Eiweißfehlers, der bei 0,5, 1 und 2%igen Lösungen aber nicht signifikant wurde. Auch kam es nicht zu Eiweißkoagulierung bei Konzentrationen bis zu 10%, wie dies bei Phenol und Formalin der Fall ist. Exaktere Untersuchungen von Lo-Grippo an Viren in unterschiedlichen Plasmaverdünnungen ließen jedoch eine deutlichere Beeinflussung der viruziden Konzentrationen dahingehend erkennen, daß die Wirksamkeit von BPL mit dem zunehmenden Prozentgehalt an Eiweiß sich geradlinig vermindert (63). Wie aus der Abbildung 7 hervorgeht, betrug die notwendige Erhöhung der BPL-Konzentration aber nur 500 mg/l (= 0,5 Gew.%) für jeweils 30% Plasma-Eiweiß. Es empfiehlt sich daher zur sicheren Keimabtötung bei Anwesenheit von Fremdeiweiß eine Erhöhung der keimtötenden Konzentrationen um 0,1%, was einer Kompensierung von ca. 60% eiweißreicher Substanz entspricht. Ebenso wenig wie Eiweiß keine grobe Inaktivierung von BPL herbeiführte, waren auch die üblichen Enthemmungsmittel wie Tween, Thioglykolat, Cystein und Seife sowie verschiedene Detergentien (50) nicht in der Lage, BPL zu neutralisieren bzw. in seiner Wirkung herabzusetzen.

Bei den Bakteriostaseversuchen fiel auf, daß die wachstumshemmende Wirkung von BPL im Vergleich zur hohen bakteriziden Wirksamkeit relativ gering war. Vielmehr lagen die bakteriostatischen Grenzwerte nahe bei den bakteriziden Grenzwerten: Staph. aureus haemolyticus SG 511 bei einer Verdünnung von 1: 800 (= 0,125 Vol%). Dieser Effekt ist jedoch aus dem chemischen Verhalten von BPL ersichtlich, wonach die Substanz bei 37°C (= Temperatur des Bakteriostasetestes) ja sehr schnell abbaut und nach 2 Stunden keine keimtötenden Eigenschaften mehr besitzt, worauf im einzelnen im Abschnitt III/3 eingegangen wurde. Die BPL-Wirkung ist also schon zu einem Zeitpunkt abgeklungen, in dem das Keimwachstum gerade erst beginnt.

Da unsere Voruntersuchungen den Beweis für die keimtötende Wirksamkeit von BPL an grampositiven und -negativen Bakterien, Pilzen und Bakteriensporen erbrachten und für eine große Zahl anderer Keime die günstigen Ergebnisse anderer Autoren vorliegen, konnte die Erprobung der Substanz am Objekt - an Wäschestoffen und an der Fläche - aussichtsreich erscheinen.

Erste Versuche zur Wäschedesinfektion wurden von Gillissen an mit tuberkulosebakterienhaltigem Kavernensputum verunreinigten Stoffen unternommen.

Nach seinen Ermittlungen liegt die tuberkulozide BPL-Konzentration zwischen 0,5 und 0,1% bei einer Temperatur von 10 bzw. 20°C und 4 Stunden Einwirkzeit. Die von ihm benutzte Ausgangslösung war nur 30%ig (12). Hartman und LoGrippo betonten jedoch, daß zur Erzielung eindeutiger Ergebnisse mindestens 96%ige gereinigte Lösungen von BPL verwandt werden sollen, da bereits 85%ige Lösungen störende Beimengungen von Abbauprodukten und Polymeren enthalten (32, 70, 72). So ist anzunehmen, daß bei Verwendung hochprozentiger, gereinigter Ausgangslösungen bei den angegebenen Konzentrationen bereits in kürzester Zeit ein tuberkulozider Erfolg an Waschgut zu erreichen ist.

Die Untersuchungen von v. Kiel an engmaschigem Batist, der mit grampositiven und gramnegativen Bakterien infiziert war, erbrachten ähnliche Ergebnisse wie die unsrigen. Sie konnte mit 1%igen BPL-Lösungen alle getesteten Keime (*Staph. aureus haemolyticus* SG 511, *E. coli*, *Ps. aeruginosa*) innerhalb 60 Minuten abtöten, wobei auch das Anhaften von eingetrocknetem Blut keine Wirkminderung verursachte. Die genannten Versuche entbehrten jedoch der Vollständigkeit, da nur eine Stoffart zur Desinfektion gelangte.

In unseren Versuchen gelangten nach den Forderungen der "Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel" (53) zwei Stoffarten, Halbleinen und Wollflanell, zur Desinfektion. Dabei vermochten 1%ige BPL-Lösungen *Staph. aureus haemolyticus* SG 511 in 60 Minuten, *Ps. aeruginosa* und *Proteus vulgaris* in 30 Minuten abzutöten. Bei geringeren Konzentrationen (0,1 und 0,25%) trat an den beiden Stoffproben ein etwas unterschiedlicher Desinfektionserfolg auf, der eine etwas schnellere Entkeimung des Halbleinens erkennen ließ. Die Ursache dafür kann wohl in einer vermehrten Absorption oder geringeren Durchdringungsfähigkeit des Desinfektionsmittels, bedingt durch die Gewebsstruktur des Wollflanells, gesehen werden. Verglichen wir jedoch unser BPL mit der desinfizierenden Wirkung von Formalin und Phenol an Waschgut, so können wir feststellen, daß es diesen Substanzen überlegen ist. Formalin bedarf in 3%iger Lösung bei der Wäschedesinfektion einer Einwirkzeit von 4 Stunden, die 1,5%ige Lösung 12 Stunden; Phenol in 2- bzw. 1%iger Lösung bedarf ebenfalls einer Einwirkzeit von 4 und 12 Stunden (97). Nach den Untersuchungen von Hartman und LoGrippo war die Durchdringungsfähigkeit von BPL bei der Sterilisation von Transplantationsmaterial dem Formalin überlegen (32), zur gleichen Feststellung kamen auch Hoffman und Warshowsky bei der Anwendung dieser Substanz in der Dampfphase (36). Ein weiterer Vorteil des BPL gegenüber Formalin ist, daß es nicht zu Eiweißausfällungen und damit zu bleibenden Flecken führt.

Auf Grund dessen, daß BPL keine Aktivitätseinbuße durch den pH-Wert des Milieus erfährt (63), ferner durch Ballaststoffe, Seifen und Detergentien (50) nur wenig beeinträchtigt wird, scheint die Substanz durchaus zur Wäschedesinfektion geeignet. Inwieweit sich jedoch das Mittel auch im Großversuch eignet, wenn mehrere und verschiedenartige Wäschestücke sich in einer Waschmaschine befinden, bleibt dahingestellt. Denn nach Arzt (zit.n. 50) ist es denkbar, daß eine Wirkstoffminderung eintritt, wenn Wäsche Stück für Stück in die Lösung gebracht wird, d.h. die ersten Wäschestücke konzentrieren dann mehr Wirkstoff auf ihrer Oberfläche als die nachfolgenden. Auch bedarf die Frage der Gewebszersetzung noch genauerer Untersuchung. Wie Feazel und Lang (10) zeigen konnten und wir selber in einem Fall erlebten (s.a. Kap. IV), war besonders das heute so häufig für Kleidungsstoffe verwandte Nylon sehr empfindlich gegenüber BPL, wobei aber höhere Konzentrationen zur Einwirkung kamen. Bei den von uns verwandten Stoffproben waren allerdings, auch nach mehrmaligem Gebrauch, keine sichtbaren Gewebsveränderungen festzustellen.

Unser Hauptaugenmerk richteten wir auf die Flächendesinfektion mit BPL, die bisher nur im Aerosolverfahren von Husmann untersucht wurde (39). Er konnte nach 30 Minuten und z.T. weniger an Linoleumflächen, die mit Staph. aureus und albus sowie E.coli und T₃-Phagen künstlich infiziert waren, mit einer Konzentration von 0,5 mg BPL/1 Luft einen vollen Desinfektionserfolg erzielen. Auch uns gelang es, auf solchen Keimträgern bereits nach 30 Minuten Staph.aureus haemolyticus SG 511 mit einer 1%igen und E.coli sogar mit einer 0,5%igen wässrigen BPL-Lösung abzutöten. Auch geringere Konzentrationen erwiesen sich noch als wirksam: Abtötung von SG 511 mit 0,25% BPL in 4 bis 6 Stunden, E.coli mit 0,1% BPL nach 3 bis 4 Stunden. Die absichtlich von uns gewählte unterschiedliche Rauigkeit der Linoleumplatten hatte keinen Einfluß auf den Desinfektionserfolg.

Da BPL auf Grund seines schnellen hydrolytischen Abbaus bald an Aktivität verliert, wurde eine Reinfektion der Platten nach 4 bis 6 Stunden durch Keime der Umgebung beobachtet. Dies ergaben Kontrolluntersuchungen in der Subkultur, bei denen zwar der Testkeim nicht mehr nachweisbar war, sich jedoch einige Kolonien von Staph.albus und Proteus vulgaris entwickelten. Der Zeitpunkt der sich äußernden Reinfektion fiel dabei mit dem Ablauf der Halbwertszeit in auffälliger Weise zusammen, die bei Zimmertemperatur ca. 4 Stunden beträgt (36). Kontrollen, die vor Ablauf der 4 Stunden von den Linoleumplatten gemacht wurden, waren absolut negativ.

Die fungizide Wirkung von BPL an Holzstäbchen war bereits mit 0,25%igen

BPL-Lösungen innerhalb 15 Minuten gegenüber *Aspergillus niger* und *Trichophyton pedis* Kaufmann-Wolf zu erzielen. *Trichophyton* wurde sogar schon mit 0,1%iger Lösung in dieser Zeit abgetötet. Der Zusatz von 0,5% Kali-Schmierseifenlösung zur Subkultur ließ keine Neutralisation des Wirkstoffes erkennen; die Versuche mit und ohne Seifenzusatz waren vollkommen identisch ausgefallen. Selbst nach 4 Wochen war unter den genannten Bedingungen keinerlei Pilzwachstum nachweisbar. Damit war die nach den Richtlinien für die Prüfung von Scheuerdesinfektionsmitteln gegen Pilze geforderte mindeste Wachstumshemmung bis zu 21 Tagen (53) über dieses Maß hinaus erfüllt.

Schließlich wurde auch der Beweis für die sporozide Wirkung von BPL an rauen Glasperlen als Keimträger erbracht. Eine Konzentration von 0,5% BPL konnte innerhalb zwei Stunden die Sporen abtöten; für die 1%ige Lösung war nur eine Einwirkzeit von 45 Minuten erforderlich.

Wenn wir nun BPL zur allgemeinen Scheuerdesinfektion (außer Tuberkulose) an Linoleum-, Holz- und Glasflächen in 1%iger wässriger Lösung mit einer Einwirkzeit bis zu 1 Stunde empfehlen, haben wir gleichzeitig auch einen hohen Sicherheitsfaktor eingebaut, durch den grampositive und -negative Bakterien und Bakteriensporen gleichermaßen sicher abgetötet werden. Für die Scheuerdesinfektion bei Hautpilzkrankungen scheint jedoch nach unseren Ergebnissen bereits eine 0,25%ige Lösung bei 30 Minuten Einwirkzeit ausreichend. Vergleichen wir diese Maßgaben mit den Konzentrationen und Einwirkungszeiten solcher Desinfektionsmittel, die in die "II. Liste der nach den 'Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel' geprüften und von der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie als wirksam befundenen Desinfektionsmittel" (97) aufgenommen wurden, so finden sich dort durchschnittlich weit höhere Konzentrationen angegeben, die zudem für Einwirkungszeiten von 4 bis 6 Stunden berechnet sind; Handelspräparate auf der Grundlage arylierter und halogener Phenole, Formalin- und Kresolpräparate bedürfen allgemein einer Anwendung in 1- bis 3%iger Lösung, bei Staphylokokkenhospitalismus werden Erhöhungen auf 4- bis 5%ige Lösungen notwendig (97).

Kommen wir jedoch auf die Nachteile von BPL zu sprechen, so ist es noch fraglich, ob BPL sich in der Praxis zur laufenden Desinfektion durchsetzen kann. Für die Haltbarkeit der Substanz kann nur garantiert werden, wenn sie hoch konzentriert (97%ig), in gereinigter Form stets bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt wird. Damit stellt sie jedoch ein Ätzwirkstoff dar. Die BPL-Verdünnungen müssen stets frisch angesetzt werden und schnell zur Anwendung

gelangen. Außerdem muß auch vor dem häufigen Kontakt mit diesen Verdünnungen beim Scheuervorgang gewarnt werden, nachdem sich bei wiederholter Einwirkung auf Mäuse und Ratten, auch bei geringen Konzentrationen, ein kanzerogener Effekt gezeigt hat (82, 83, 85, 93). Ferner soll die Substanz relativ teuer sein (38), wodurch das Desinfektionsverfahren unwirtschaftlich würde. Das Department of Health, Education and Welfare in Washington hat jedoch wegen seiner sonst großen Vorzüge die Substanz bereits 1959 günstig aufgenommen und sie zur Anwendung in der Dampfphase besonders im Falle einer biologischen Kriegführung empfohlen (9).

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Bedeutung der chemischen Wäsche- und Flächendesinfektion wird diskutiert. - In größerem Umfang kommen die bisherigen Untersuchungen über das physikalische und chemische Verhalten von Beta-Propiolakton (BPL), seine Anwendung und die Methoden zur Sterilisierung von biologischem Material, sowie die Raumdesinfektion mit BPL in der Dampfphase zur Darstellung. Die Wirkungsweise von BPL und bedeutsame Faktoren bei der Sterilisation und Desinfektion werden erörtert und die bisherigen Ergebnisse über Toxizität und Materialschädigungen, die bisher kaum Berücksichtigung fanden, herausgestellt.

In orientierenden Voruntersuchungen testeten wir die entwicklungshemmenden und keimtötenden Eigenschaften von BPL *in vitro* sowie eine eventuelle Neutralisation durch sogenannte Enthemmungsmittel (Tween, Cystein, Thioglykolat) und die Frage des Eiweiß- und Seifenfehlers. Alle diese Untersuchungen führten zu günstigen Ergebnissen.

Anschließend folgen die Untersuchungen zur Wäsche und Flächendesinfektion, die den Verhältnissen der Praxis angepaßt sind und einen guten Desinfektionseffekt erkennen lassen, der im Vergleich mit den herkömmlichen chemischen Desinfizienten, diesen durchaus überlegen zu sein scheint. Eine Einschränkung erfährt jedoch die Anwendung des Mittels wegen einiger noch ungeklärter toxikologischer Probleme und der noch offenstehenden Frage einer Schädigung von Natur- und besonders Kunstfasergeweben. Im übrigen ist die Frage der Brauchbarkeit von BPL zur Desinfektion von Flächen (Linoleum, Holz und Glas) zu bejahen. Die für die Praxis bedeutsame wirtschaftliche Seite dieses Desinfektionsverfahrens - es soll z.Zt. noch sehr kostspielig sein - läßt sich aber auf die Dauer vielleicht von seiten des Herstellers abändern.

LITERATUR

1. Bartlett, P.D. and Small, G.: β -Propiolactone. IX. The kinetics of attack by nucleophilic reagents upon the alcoholic carbon of β -propiolactone.
J. Am. Chem. Soc. 72: 4867-4869 (1950)
2. Bartlett, P.D. and Rylander, P.N.: β -propiolactone. XII. Mechanisms involved in the reaction of β -propiolactone with acids and bases.
J. Am. Chem. Soc. 73: 4273-4274 (1951)
3. Brand, P.W.: Die chirurgische Wiederherstellung von Leprapatienten. Triangel: 6/2, 53 (1963)
4. Bruch, C.W.: Decontamination of enclosed spaces with beta-propiolactone vapor.
Am. J. Hygiene 73/1: 1-9 (1961)
5. Bruch, C.W.; Koesterer, M.G.: Destruction of enteric bacteria in liquid egg with β -propiolactone.
App. Microbiol. 10: 123 - 128 (1962)
6. Dawson, F.W., Hearn, H.J. and Hoffman, R.K.: Virucidal activity of β -propiolactone vapor. I. Effect of β -propiolactone vapor on Venezuelan Equine Encephalomyelitis virus.
Appl. Microbiol. 7/4: 199-201 (1959)
7. Dawson, F.W., Janssen, R.J. and Hoffman, R.K.: Virucidal activity of β -propiolactone vapor. II. Effect on the etiological agents of Smallpox, Yellow Fever, Psittacosis, and Q Fever.
Appl. Microbiol. 8/1: 39-41 (1960)
8. Della Volpe, R., Gandini, A. and Merelli, G.M.: Action in vitro of β -propiolactone on transplantable tumors of animals.
Pathologica 53: 339-347 (1961)
9. Emergency Manual Guide HEW-2. Effects of biological warfare agents. Dept. of Health, Education and Welfare, Washington, D.C., p.17 (1959), zit. n. 4.
10. Feazel, C.E. and Lang, E.W.: New Vapor Phase Disinfectant. Soap and Chemical Specialities 35: 113-121 (1959)

11. Freudenberg, K.: Organische Chemie.
Verlag Quelle & Meyer, Heidelberg, 7. Aufl. 1950
12. Gillissen, G.: Die Abtötung von Tuberkelbakterien durch Beta-Propiolakton.
Desinfektion und Gesundheitswesen 1/1960
13. Gresham, T.L., Jansen, J.E. and Shaver, F.W.: β -propiolactone, I. Polymerization reactions.
J. Am. Chem. Soc. 70: 998-999 (1948)
14. Gresham, T.L., Jansen, J.E., Shaver, F.W. and Gregory, J.T.: β -propiolactone. II. Reactions with salts of inorganic acids.
J. Am. Chem. Soc. 70: 999-1001 (1948)
15. Gresham, T.L., Jansen, J.E. and Shaver, F.W.: β -propiolactone. III. Reactions with dithiocarbamic acids, their salts and thiourea.
J. Am. Chem. Soc. 70: 1001-1002 (1948)
16. Gresham, T.L., Jansen, J.E. and Shaver, F.W.: β -propiolactone. IV. Reactions with salts of carboxylic acids.
J. Am. Chem. Soc. 70: 1003-1004 (1948)
17. Gresham, T.L., Jansen, J.E., Shaver, F.W., Gregory, J.T. and Beeears, W.L.: β -propiolactone. V. Reaction with alcohols.
J. Am. Chem. Soc. 70: 1004-1006 (1948)
18. Gresham, T.L., Jansen, J.E., Shaver, F.W., Bankert, R.A., Beeears, W.L. and Prendergast, M.G.: β -propiolactone. VI. Reactions with phenols, thiophenols and their salts.
J. Am. Chem. Soc. 71: 661-663 (1949)
19. Gresham, T.L., Jansen, J.E., Shaver, F.W. and Bankert, R.A.: β -propiolactone. VII. Reactions with Grignard Reagents.
J. Am. Chem. Soc. 71: 2807-2808 (1949)
20. Gresham, T.L., Jansen, J.E. and Shaver, F.W.: β -propiolactone. VIII. Reactions with organic and inorganic acids, acid chlorides and anhydrides.
J. Am. Chem. Soc. 72: 72-74 (1950)
21. Gresham, T.L., Jansen, J.E., Shaver, F.W., Frederick, M.R. and Beeears, W.L.: β -propiolactone. X. Reactions with compounds containing active methylenic hydrogen.
J. Am. Chem. Soc. 73: 2345-2347 (1951)

22. Gresham, T.L., Jansen, J.E., Shaver, F.W., Bankert, R.A. and Fiedorek, F.T.: β -propiolactone. XI. Reactions with ammonia and amines.
J. Am. Chem. Soc. 73: 3168-3171 (1951)
23. Gresham, F.L., Jansen, J.E., Frederick, M.R., Shaver, F.W., Fiedorek, F.T., Bankert, R.A., Gregory, J.T. and Beears, W.L.: β -propiolactone. XIII. Reactions with sodium nitrite, sodium dithionite, sodium cyanide, sodium thiocyanate, sodium succinimide and aryl sulfinic acids and their salts.
J. Am. Chem. Soc. 74: 1323-1325 (1952)
24. Grün, L.: Desinfektion in der Krankenhauspraxis.
Krankenhaus 50/5: 185-188 (1958)
25. Hartman, F.W., Mangun, G.H., Feeley, N. and Jackson, E.: On the chemical sterilization of blood and blood plasma.
Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 70: 248-254 (1949)
26. Hartman, F.W., Piepes, S.L. and Wallbank, A.M.: Virucidal and bactericidal properties of β -propiolactone.
Fed. Proc. 10: 358 (1951)
27. Hartman, F.W. and Kelly, A.R.: Tissue toxicity of beta-propiolactone and its degradation products.
Fed. Proc. 12: 390 (1953)
28. Hartman, F.W., LoGrippo, G.A. and Kelly, A.R.: Combined procedures for virus inactivation in blood.
Fed. Proc. 13: 430 (1954)
29. Hartman, F.W., LoGrippo, G.A. and Kelly, A.R.: Preparation and sterilization of blood plasma.
Am. J. Clin. Path. 24: 339-348 (1954)
30. Hartman, F.W., Kelly, A.R. and LoGrippo, G.A.: Four year study concerning the inactivation of virus in blood and plasma.
Gastroenterology 28: 244-256 (1955)
31. Hartman, F.W., LoGrippo, G.A. and Kelly, A.R.: Procedure for sterilization of plasma using combinations of ultraviolet irradiation and beta-propiolactone.
Fed. Proc. 15: 518 (1956)

32. Hartman, F. W. and LoGrippe, G. A.: Beta-propiolactone in sterilization of vaccines, tissue grafts and plasma.
J. Am. Med. Ass. 164: 258-259 (1957)
33. Hartman, F. W. and LoGrippe, G. A.: Combined beta-propiolactone and ultraviolet irradiation for plasma sterilization.
International Symposium Hepatitis Frontiers, Boston, Little, Brown & Co. 6: 407-417 (1957)
34. Hayashi, H. and LoGrippe, G. A.: Inactivation of vacuolating virus (SV 40) by beta-propiolactone. I. Evaluation in tissue culture.
Henry Ford Hosp. Med. Bull. 10: 463-470 (1962)
35. Hayashi, H. and LoGrippe, G. A.: Inactivation of vacuolating virus (SV 40) by betaprone. II. Evaluation of the oncogenic properties of SV 40 in hamsters after inactivation with betaprone.
Henry Ford Hosp. Med. Bull. 11: 93-97 (1963)
36. Hoffman, R. K. and Warshowsky, B.: Beta-propiolactone vapor as a disinfectant.
Appl. Microbiol. 6: 358-362 (1958)
37. Huddleson, I.: Effect of Beta-propiolactone on cells of three colonial types of Brucella.
Quart. Bull. of Mich. Agric. Exp. Sta. 37: 574-580 (1955)
38. Husmann, K. H.: Über die antimikrobiellen Eigenschaften von Beta-Propiolakton.
Desinfektion und Gesundheitswesen 52, 7/8: 101 (1960)
39. Husmann, K. H.: Untersuchungen zur Raumdesinfektion mit Beta-Propiolakton in Aerosolform.
Zbl. biol. Aerosol-Forsch. 9, 3/4: 179-194 (1960)
40. Husmann, K. H. u. Poklikay, E.: Vergleichende Untersuchungen zur Raum-entseuchung mit Formalin- und Beta-Propiolaktonaerosolen.
(Erscheint im Zbl. biol. Aerosol-Forsch.)
41. Johansson, C.: Lund University, Annual, New Series, Div. 2, Vol. 12, No. 8 (1915), zit. n. 65
42. Johnson, S. A. and Babinsky, D. H.: Platelet Factor - 3 in blood coagulation.
Fed. Proc. 17: 81 (1958)

43. Kelly, A.R., Manguin, G.H., Sanders, B.E. and Hartman, F.W.:
Fed.Proc. 9: 335 (1950)
44. Kelly, A.R. and Hartman, F.W.: Beta-propiolactone; its toxicity, degradation products and comparison with nitrogen mustards.
Fed.Proc. 10: 361 (1951)
45. Kelly, A.R. and Hartman, F.W.: Biological effects of Beta-propiolactone.
Fed.Proc. 11: 419 (1952)
46. Kelly, A.R.: Effects of virucide Beta-propiolactone and its degradation products on blood platelets.
Fed.Proc. 11: 419 (1952)
47. Kelly, A.R., Rupe, C.E., Tazuna, J.J. and Hartman, F.W.: The toxicity of Beta-propiolactone degradation products in the dog and man.
Fed.Proc. 13: 434 (1954)
48. Kelly, A.R., Tazuna, J.J. and Hartman, F.W.: Tissue distribution and fate of hydracrylic acid.
Fed.Proc. 14: 409 (1955)
49. Kelly, A.R., Hartman, F.W. and Rupe, C.E.: The toxicology of beta-propiolactone.
International Symposium Hepatitis Frontiers, Little, Brown & Co, Boston, 387-406 (1957)
50. Kiel, O.v.: Experimenteller Beitrag zur Desinfektion von Waschgut mit Beta-Propiolakton.
Inaug.-Diss. Mainz 1960
51. Kikuth, W.: Der moderne Hospitalismus aus mikrobiologischer und hygienischer Sicht.
Dtsch.med.Wschr. 85/44, 1920-1925 (1960)
52. Kliewe, H.: Leitfaden der Entseuchung und Entwesung.
Ferd.Enke Verlag, Stuttgart (1951)
53. Kliewe, H., Heiken, K., Schmidt, B., Wagener, K., Wüstenberg, J., Ostertag, H., Grün, L., Lammers, Th. und Mühlens, K.: Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1959)
54. Kung, F.E.: Preparation of beta-lactone.
U.S.Patent 2, 356, 459 (1944)

55. Lammers, T.: Situation und Probleme der chemischen Desinfektion in Klinik und Praxis.
Die Heilkunst 76/8, August 1963
56. Lépine, P. et Atanasiu, P.: Sur la valeur antigénique et vaccinante du Virus de Newcastle inactivé par la Bêta-propiolactone.
Ann. Inst. Pasteur 91/1: 100-102 (1956)
57. Lépine, P. et Sautter, V.: Inactivation des virus par l'action combinée de deux agents inactivants employés à doses ménagées. Comp. rend. Acad. Sc. 244, 16: 2200-2201 (1957)
58. LoGrippe, G. A., Overhulse, P. R. and Szilagyi, D. E.: Procedure for the sterilization of contaminated arterial grafts with Beta-propiolactone.
Bact. Proc. May, 61 (1954)
59. LoGrippe, G. A., Kelly, A. R. and Hartman, F. W.: Beta-propiolactone and ultraviolet combination for the sterilization of Plasma.
Presented before the panel on Sterilization of Blood and Plasma of the National Research Council, April 7, 1954 (zit. nach 63)
60. LoGrippe, G. A. and Hartman, F. W.: Antigenicity of Beta-propiolactone - inactivated virus vaccines.
J. Immunol. 75: 123-128 (1955)
61. LoGrippe, G. A., Overhulse, P. R., Szilagyi, D. E. and Hartman, F. W.: Procedure for sterilization of arterial homografts with Beta-propiolactone.
Lab. Invest. 4: 217-231 (1955)
62. LoGrippe, G. A.: Sterilization of homostatic grafts with beta-propiolactone.
Bact. Proc. p. 101, April 29, 1956 (zit. nach 63)
63. LoGrippe, G. A. and Rupe, C. E.: Chemical sterilization of whole blood and plasma with Beta-propiolactone.
International Symposium Hepatitis Frontiers, Little, Brown & Co., Boston, 371-385 (1957)
64. LoGrippe, G. A., Burgess, B., Theodoro, R. and Flemming, J. L.: Procedure for bone sterilization with Beta-propiolactone.
Bone & Joint Surg. 39: 1956 (1957)
65. LoGrippe, G. A.: Beta-propiolactone for the sterilization of biological materials.
Henry Ford Hosp. Med. Bull. 5: 94-99 (1957)

66. LoGrippe, G.A.: Antigenicity of combined Beta-propiolactone and ultra-violet inactivated virus vaccines.
J.Immunol. 80: 198-203 (1958)
67. LoGrippe, G.A.: Sterilization of Platelet Factor - 3 with Beta-propio-lactone and ultraviolet irradiation.
Fed.Proc. 17: 524 (1958)
68. LoGrippe, G.A.: The hazards in the use of serum for tissue culture media.
Univ.Mich.Med.Bull. zit. n. 91
69. LoGrippe, G.A., Eidam, C.R. and Truden, J.L.: Beta-propiolactone.- Chemical procedure for the sterilization of serum for tissue culture media. (Ohne Quellenangabe zit. nach 91)
70. LoGrippe, G.A.: Investigations of the use of Beta-propiolactone in virus inactivation.
Ann. N.Y.Acad.Sci. 83/4: 578-594 (1960)
71. LoGrippe, G.A.: The safety of β -propiolactone as a biologic sterilizing agent.
Angiology 12: 80 (1961)
72. LoGrippe, G.A.: Serum hepatitis and the clinical evaluation of blood components sterilized with Beta-propiolactone.
Bibl.Haemat. 13: 504-509 (1962)
73. Mack, W.N. and Chotisen, A.: Serological response in chickens to Beta-propiolactone treated Newcastle Disease Virus.
Proc.Soc.Exp.Biol.&Med. 91: 288-290 (1956)
74. Mack, W.N. and Chotisen, A.:
Poultry Sc. 34: 1010 (1955) zit. nach 73
75. Monto, R.W.: New approach to the thrombocytopathies (Thrombo-cytopathy A).
Fed.Proc.17: 396 (1958)
76. Palmes, E.D., Orris, L. and Nelson, N.: Skin irritation and skin tumor production by beta-propiolactone (BPL).
Am.Industr.Hyg.Ass. 23: 257-264 (1962)

77. Peck, F.B., Jr., Powell, M.H. and Culbertson, C.G.: Study of fixed virus vaccine killed with Beta-propiolactone (BPL)
J. Am. Med. Ass. 162/15: 1373 (1956)
78. Polley, J.R. and Guerin, M.M.: The use of Beta-propiolactone for the preparation of virus vaccines. I. Selection of reaction conditions.
Canad. J. Microbiol. 3: 863-870 (1957)
79. Polley, J.R. and Guerin, M.M.: The use of Beta-propiolactone for the preparation of virus vaccines. II. Antigenicity.
Canad. J. Microbiol. 3: 871-877 (1957)
30. Powell, H.M. and Culbertson, C.G.: Antirabies Vaccine prepared from fixed virus grown in embrionated duck eggs and killed with Beta-propiolactone.
Bact. Proc. 70: April (1956)
81. Rains, A.J., Crawford, N., Sharpe, S.H., Shrewsbury, J.F.D. and Barson, G.J.: Management of an Artery-Graft Bank with special reference to sterilization by Beta-propiolactone.
Lancet 271: 830-832 (1956)
82. Roe, F.J.C. and Salaman, M.H.: Further studies on incomplete carcinogenesis: Triethylene Melamine (T.E.M.), 1, 2-Benzanthracene and β -propiolactone, as initiators of skin tumor formation in the mouse.
Brit. J. Cancer, 9: 177-203 (1956)
83. Roe, F.J.C. and Glendenning, O.M.: The carcinogenicity of β -propiolactone for mouse skin.
Brit. J. Cancer 10: 357-362 (1956)
84. Sanders, B.E. and Maykut, M.: Effects of Beta-propiolactone on blood components.
Fed. Proc. 10: 242 (1951)
85. Searle, C.E.: Experiments on the carcinogenicity and reactivity of β -propiolactone.
Brit. J. Cancer 15: 804-811 (1961)
86. Spinner, D.R. and Hoffman, R.K.: Method for disinfecting large inclosures with Beta-propiolactone vapor.
Appl. Microbiol. 8/3: 152-155 (1960)

87. Stone, S.S. and Delay, P.D.: The inactivation of rinderpest virus by β -propiolactone and its effect on homologous complement-fixing and neutralizing antibodies.
J.Immun. 87: 464-467 (1961)
88. Szilagyí, D.E., Overhulse, P.R., Shonnard, C.P. and LoGrippe, G.A.: Sterilization of human arterial homografts with Beta-propiolactone. Experimental and clinical observations.
Surg.Forum 5: 244-252 (1954)
89. Szilagyí, D.R., Shonnard, C.P. and LoGrippe, G.A.: The arteria bank.
Henry Ford Hosp. Med. Bull. 3: 82-89 (1955)
90. Szilygyí, D.E., McDonald, R.T., Smith, R.F. and Whitcomb, J.G.: Biological fate of human arterial homografts.
A.M.A.Arch.Surg. 75: 506 (1957)
91. Testagar & Co., Inc. (Detroit, USA): Betaprone for the sterilization of vaccines, tissue grafts and plasma.
92. Trafas, P.C., Carlson, R.E., LoGrippe, G.A. and Lam, C.R.: Chemical sterilization of arterial homografts.
A.M.A.Arch.Surg. 69: 415-425 (1954)
93. Walpole, A.L., Roberts, D.C., Rose, F.L., Hendry, J.A. and Homer, R.F.: Cytotoxic agents. IV. The carcinogenic action of some monofunctional ethyleneimine derivatives.
Brit.J.Pharmacol. 9: 306-323 (1954)
94. Whitehouse, F., jr., Williams, P.K. and Falls, H.F.: The effect of Beta-propiolactone on herpa virus in vitro and in vivo.
Univ.Mich.Med.Bull. 28: 388-397 (1962)
95. Woodward, M.F. and Clark, A.B.: Hospital decontamination with Beta-propiolactone vapor.
U.S.Armed Forces Med.J. 11: 459-463 (1960)
96. Zech, R.K., Fletcher, T.L., Griffith, C.A., Nyhus, L.M. and Harkins, H.N.: Chemical preservation of vascular grafts. Effects on grafts complications.
Surg.Forum 5: 252-257 (1954)
97. II. Liste der nach den "Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel" geprüften und von der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie als wirksam befundenen Desinfektionsmittel.
Ärztl. Mitt. 42: 2409-2414 (1961)

An dieser Stelle möchte ich nochmals meinen Dank all jenen aussprechen, die bei dem Zustandekommen der Arbeit mitwirkten.

So danke ich besonders Herrn Professor Dr. Th. L a m m e r s für die freundliche Überlassung des Themas und die Erstellung des Referates.

Herrn Professor Dr. H. K l i e w e danke ich für das Korreferat.

Bei der Einarbeitung in die Literatur und die experimentellen Arbeiten stand mir Herr Dr. H u s m a n n in dankenswerter Weise beratend zur Seite.

LEBENS LAUF

Ich wurde am 4. Oktober 1932 als Sohn des Diplomlandwirtes Friedrich Karl Grass und seiner Ehefrau Gertrude, geb. Buchholz, in Wipperfürth, Rheinisch-Bergischer Kreis, geboren. Ich habe noch fünf Geschwister.

1937 zog die Familie nach Liegnitz in Niederschlesien. Dort besuchte ich die Grundschule und das Gymnasium bis zur Quinta. 1945 flohen wir zurück in die alte Heimat im Bergischen Land. Hier besuchte ich zunächst wieder die Volksschule und später das Staatliche Gymnasium in Aufbauform in Wipperfürth. Die Schulzeit wurde durch eine einjährige Krankheit unterbrochen.

1955 Abitur und Beginn des Medizinstudiums an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz. Im Herbst 1957 bestand ich dort das Physikum. Während der ersten klinischen Semester arbeitete ich bei Professor Dr. Langreder (Mainz) in der Geburtshilfe über Methoden zur Zervixweitenmessung unter der Geburt, deren erste Ergebnisse auf dem Gynäkologen-Kongreß in Frankfurt veröffentlicht wurden. 1960/61 unternahm ich die experimentellen Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit, deren Thema mir freundlicherweise von Herrn Professor Dr. Th. Lammers überlassen wurde. Die weitere Ausführung der Arbeit mußte aber wegen des Staatsexamens, das ich am 1. August 1961 bestanden habe, und anschließender Medizinalassistentenzeit unterbrochen werden.

Bisher habe ich in der Chirurgie und Inneren Medizin gearbeitet. Zur Fertigstellung der Dissertation habe ich z. Zt. die weitere klinische Ausbildung unterbrochen.

